

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
8 février 2001 (08.02.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/09288 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷: C12N 5/06,
5/08, A61K 35/14, A61P 37/00

(74) Mandataires: GILLARD, Marie-Louise etc.; Cabinet
Beau de Loménie, 158, rue de l'Université, F-75340 Paris
Cedex 07 (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:

PCT/FR00/2173

(81) États désignés (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Date de dépôt international: 28 juillet 2000 (28.07.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:
99/09836 29 juillet 1999 (29.07.1999) FR

(84) États désignés (régional): brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KC, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US): CEN-
TRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE [FR/FR]; 191,
avenue du Doyen Gaston Giraud, F-34000 Montpellier
(FR). CELLGEN SARL [FR/FR]; 314, rue du Mas du
Juge, F-34980 Saint Gely du Fesc (FR).

Publiée:

- Avec rapport de recherche internationale.
- Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont
reçues.

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): KLEIN,
Bernard [FR/FR]; 83, allée des Bœureuils, F-34980
Saint Clément de Rivière (FR). TARTIE, Karin [FR/FR];
Terrasses de l'Oliveraie - B213, Rue H. Branly, F-34790
Grabels (FR).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING DENDRITIC CELLS, RESULTING DENDRITIC CELLS AND USES THEREOF FOR
CLINICAL PURPOSES

(54) Titre: PROCEDE D'OBTENTION DE CELLULES DENDRITQUES, LES CELLULES DENDRITQUES AINSI OBTENUES ET LEURS UTILISATIONS A DES FINS CLINIQUES

(57) Abstract: The invention concerns a method for obtaining dendritic cells which consists in: 1) culturing, during 4 to 6 days, preferably 5 days, mononucleate cells derived from cytopheresis after mobilisation, in a serum-free medium with added human albumen in the presence of a granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and interleukin (IL) blocking the differentiation towards the macrophage path; 2) adding to the culture medium TNF- α and optionally an inflammatory mediator and proceeding with the culture during 1 to 4 days, preferably 2 more days; 3) recuperating the resulting dendritic cells. Said cells are useful in immunotherapy.

(57) Abrégé: La présente invention a pour objet un procédé pour l'obtention de cellules dendritiques qui consiste: 1) à cultiver, pendant 4 à 6 jours, de préférence 5 jours, des cellules mononucléées issues de cytophérèse après mobilisation, dans un milieu exempt de sérum complétement avec de l'albumine humaine en présence d'un facteur stimulant les colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF) et d'un interleukine (IL) bloquant la différenciation vers la voie macrophagique; 2) à ajouter au milieu de culture du TNF- α et éventuellement un médiateur inflammatoire et à poursuivre la culture pendant environ 1 à 4 jours, de préférence 2 jours supplémentaires; 3) à récupérer les cellules dendritiques ainsi formées. Applications: agents d'immunothérapie.

BEST AVAILABLE COPY



WO 01/09288 A1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PROCEDE D'OBTENTION DE CELLULES DENDRITIQUES, LES CELLULES DENDRITIQUES AINSI OBTENUES ET LEURS UTILISATIONS A DES FINS CLINIQUES

La présente invention concerne le domaine de l'immunothérapie et plus particulièrement celui des cellules dendritiques et de leur utilisation à titre d'agent
5 d'immunothérapie.

Les cellules dendritiques (DC) jouent un rôle clé dans l'initiation de la réponse immunitaire primaire et des études cliniques pilotes ont mis en évidence leur capacité à induire une immunité anti-tumorale efficace.

Les cellules dendritiques, qui sont présentes dans la peau (cellules de
10 Langerhans), dans les muqueuses, le sang périphérique et la moelle osseuse, sont les cellules présentant des antigènes (Antigen-presenting cells ou APC) les plus puissantes dans le système immunitaire. Elles sont caractérisées par une morphologie unique et un phénotype de surface spécifique.

En particulier, elles expriment l'antigène CD83 et sont capables d'exprimer
15 des quantités importantes de MHC classes I et II et d'initier des réactions mixtes avec les leucocytes (MLR). En revanche, elles sont dépourvues de certains marqueurs myéloïdes, notamment du marqueur CD14.

Etant donné leurs propriétés spécifiques, ces cellules ont été proposées
20 comme éléments essentiels dans les thérapies cellulaires qui nécessitent la présentation d'antigènes aux lymphocytes T.

Les cellules dendritiques (DC) ont un mode de différenciation spécifique qui comprend deux stades importants, le stade immature et le stade mature, selon un ensemble de caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles (1,2). Les DC immatures obtenues *in vitro* à partir de monocytes par culture avec un
25 facteur stimulant les colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF) et une interleukine bloquant la différenciation vers la voie macrophagique (IL-4 ou IL-13) sont analogues aux DC du tissu périphérique, c'est-à-dire aux cellules de Langerhans et aux cellules dendritiques interstitielles. Ces DC immatures sont capables de capturer les antigènes avec une grande efficacité en utilisant des
30 récepteurs spécialisés, tels que les récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines (FcR) (3,4), le récepteur au mannose (MR) (5) et les récepteurs phagocytaires, en particulier CD36 et l'intégrine $\alpha\beta 5$ (6). Elles peuvent ainsi internaliser les protéines, les lysats de cellules entières, l'ARN et les cellules apoptotiques. En revanche, elles expriment seulement de faibles taux
35 de molécules costimulatrices nécessaires pour l'activation des lymphocytes T.

Lorsqu'elles sont exposées à des signaux de maturation, donnés principalement par les antigènes, les cytokines inflammatoires ou les produits bactériens, les DC perdent leurs capacités phagocytaires et endocytaires (5,6) mais accroissent l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I, du CMH de classe II, l'expression de CD80 et CD86 et deviennent de très puissantes cellules présentant des antigènes (APC). Le passage du stade immature au stade mature est associé à l'expression des récepteurs des chémokines. Les DC matures ont une expression diminuée de CCR1 et CCR5, qui sont les récepteurs des chémokines inflammatoires, les protéines inflammatoires de macrophages MIP-1 α , MIP-1 β et RANTES, et de façon concomitante, elles ont une expression augmentée de CCR7, qui est le récepteur pour le ligand E1B (ELC)/MIP-3 β , lequel est exprimé de façon constitutive dans les organes lymphoïdes secondaires (7-9). Ces changements dans l'expression des récepteurs des chémokines sont importants pour la circulation *in vivo* des DC. Les DC immatures sont recrutées par les chémokines inflammatoires dans les sites d'entrée des antigènes. Après activation par les antigènes et stimuli inflammatoires, elles perdent les récepteurs CCR1 et CCR5 et acquièrent l'expression de CCR7. Les DC matures peuvent ensuite entrer dans les vaisseaux lymphatiques et migrer vers les ganglions lymphatiques afférents où elles présentent des épitopes dérivés d'antigènes pour les lymphocytes naïfs et les lymphocytes mémoires présents dans ces ganglions.

Ainsi, on a déjà proposé de les utiliser en tant que vecteurs pour des vaccinations anti-tumorales (10). Récemment, Nestle et al. ont montré que l'injection intralymphatique de DC immatures activées avec des peptides tumoraux ou des lysats cellulaires tumoraux ont pu provoquer une réponse immunitaire anti-mélanome (11).

L'utilisation de cellules dendritiques à des fins d'immunothérapie nécessite plusieurs millions de cellules à plusieurs reprises. De plus, ces cellules doivent être capables de circuler dans le corps humain de manière sélective vers les ganglions pour que le traitement soit efficace. Il importe également de disposer de cellules engagées de façon irréversible dans la voie de différenciation dendritique, c'est-à-dire de cellules matures qui ne soient pas susceptibles de se transformer dans l'organisme en macrophages.

Plusieurs études concernant la modulation des récepteurs des chémokines ont été réalisées avec des DC obtenues par culture dans un milieu contenant du sérum de veau fœtal (FCS). Or, les antigènes xénogènes peuvent être

immunodominants et peuvent gêner le développement de l'immunité anti-tumorale spécifique.

Différentes équipes de chercheurs se sont donc concentrées sur la production de DC dérivées de monocytes dans des milieux exempts de FCS en utilisant des milieux complémentés avec 1 à 10 % de plasma autologue (12-17), de sérum autologue (18) ou d'un pool de sérums humains AB (13,19-22,31). Toutefois, même le sérum autologue peut poser un problème puisqu'il contient de nombreuses protéines, en particulier des anticorps (23) qui peuvent modifier la voie de fixation et de modification intracellulaire des antigènes. De plus, certains antigènes tumoraux de type MUC-1 dans plusieurs cancers ou l'immunoglobuline monoclonale dans le myélome multiple, sont présents dans le sérum à des taux élevés et variables, ce qui peut affecter une présentation reproductible par les DC.

Pour toutes ces raisons, des procédés d'obtention de DC capables d'activer les lymphocytes T dans des milieux exempts de sérum ont été proposés (24-26).

Les demandes internationales WO98/23728, WO98/06823 et WO98/06826 décrivent également des procédés d'obtention des cellules dendritiques dans des milieux exempts de sérum. La demande internationale WO98/06826 décrit entre autre l'utilisation d'un milieu exempt de sérum, le milieu X-VIVO complémenté avec 1% d'albumine humaine (HA). Il est précisé dans cette demande que l'utilisation de 1% de HA n'améliore pas de façon significative la croissance des cellules, leur phénotype ou leur capacité stimulante. De plus, l'expression de CD86 est augmentée au bout de 14 jours de culture dans un tel milieu.

On a maintenant trouvé, de façon surprenante, que l'on peut obtenir des quantités importantes de cellules dendritiques, qui peuvent être utilisées en immunothérapie par culture de cellules mononuclées particulières dans un milieu exempt de sérum convenablement complémenté avec de l'albumine humaine en présence d'un facteur stimulant la formation de colonies de granulocytes macrophages (GM-CSF) et d'une cytokine, en particulier l'interleukine-4 (IL-4) ou l'interleukine-13 (IL-13) puis en présence d'au moins un médiateur inflammatoire, tel que par exemple le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α).

Ainsi le procédé de l'invention consiste :

1) à cultiver pendant 4 à 6 jours, de préférence 5 jours des cellules mononuclées issues de cytophérèse après mobilisation dans un milieu exempt

de sérum complémenté avec de l'albumine humaine en présence d'un facteur stimulant les colonies de granulocyte-macrophage (GM-CSF) et d'une interleukine (IL) bloquant la différenciation vers la voie macrophagique ;

2) à ajouter au milieu de culture du TNF- α et éventuellement un médiateur inflammatoire et à poursuivre la culture pendant environ 1 à 4 jours, de préférence 2 jours supplémentaires ;

3) à récupérer les cellules dendritiques ainsi formées.

Avantageusement, on peut ajouter au milieu de culture, les deuxième et quatrième jours, du milieu frais contenant du GM-CSF et une interleukine.

10 Selon une variante de mise en œuvre du procédé de l'invention, on peut utiliser de la prostaglandine E2 (PGE2) conjointement avec le TNF- α .

Par "milieu de culture sans sérum" on désigne tout milieu de culture couramment utilisé pour la culture des cellules à des fins cliniques, qui contient les substances nutritives essentielles pour la croissance des cellules
15 hématopoïétiques notamment une source de carbone, d'azote, de la transferrine.

Ces milieux sont exempts de sérum humain ou de sérum animal.

Des exemples de milieux de culture exempts de sérum appropriés aux fins de l'invention sont décrits par exemple dans WO95/00632 et US5 405 772.

Des exemples particuliers de tels milieux sont les milieux X-VIVO 10 ou
20 X-VIVO 15 commercialisés par la société Biowhittaker, Walkersville, MD, USA.

Le milieu X-VIVO 15 est particulièrement préféré pour la mise en œuvre de l'invention.

Le milieu de culture doit être complémenté avec de l'albumine humaine à raison de 1 à 2 % (poids/volume), de préférence 2 %.

25 Par "cellules mononuclées" on désigne les cellules mononuclées (MNC) provenant du sang périphérique de sujets normaux ou de patients présentant un cancer ou toute autre maladie dans laquelle le système immunitaire est impliqué, telle que les maladies infectieuses, virales ou parasitaires, par exemple le Sida ou les maladies dysimmunitaires, telles que par exemple la polyarthrite
30 rhumatoïde, le lupus, etc.

Les cellules mononuclées (MNC) utilisées comme produit de départ dans le procédé selon l'invention sont des cellules mononuclées obtenues par cytophérèse après mobilisation par chimiothérapie et/ou par au moins un facteur de croissance cellulaire.

35 Ainsi, les cellules mononuclées utilisées dans le procédé de l'invention proviennent soit de sujets normaux ou de patients présentant un cancer qui ont

été soumis à une chimiothérapie, à savoir à un traitement spécifique à l'aide d'un agent chimiothérapeutique et éventuellement d'un facteur de croissance cellulaire, soit de patients présentant une maladie infectieuse, virale ou parasitaire qui ont été traités avec un facteur de croissance cellulaire, tel que les cytokines, y compris les facteurs de croissance hématopoïétiques.

A titre d'exemple de facteur de croissance qui peuvent être utilisés pour la mobilisation des cellules mononuclées, on peut citer :

- les facteurs stimulants les colonies de granulocytes (G-CSF), tels que les produits connus sous les dénominations commerciales « filgrastim NEUPOGEN » de Amgen-Roche, « Lenograstim GRANOCYTE » de Rhône-Poulenc/Chugai ;

- les facteurs stimulant les colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF), tel que les produits connus sous les dénominations commerciales LEUCOMAX de Schering Plough ou le facteur de croissance des cellules souches (SCF) de Amgen.

Les cellules mononuclées mobilisées qui sont mises en œuvre selon l'invention comprennent notamment les monocytes, les lymphocytes, les cellules souches hématopoïétiques.

La mobilisation par chimiothérapie est réalisée à l'aide de l'agent chimiothérapeutique approprié au type de cancer présenté par le patient, donneur des cellules à utiliser dans le procédé de l'invention. On peut utiliser un agent chimiothérapeutique quelconque, tel que par exemple le cyclophosphamide.

Les quantités de GM-CSF, d'interleukine, de TNF- α et de PGE2 à utiliser dans le procédé de l'invention sont celles qui sont habituellement utilisées pour les cultures cellulaires.

On précisera que le GM-CSF peut être utilisé à raison de 1 ng/ml à 1 000 ng/ml, de préférence 50 à 500 ng/ml, avantageusement 100 ng/ml de milieu.

L'interleukine est généralement utilisée en des quantités allant de 1 ng/ml à 1 000 ng/ml, de préférence 10 à 50 ng/ml, avantageusement 25 ng/ml de milieu.

On peut également utiliser le TNF- α à raison de 1 ng/ml à 1 000 ng/ml et la PGE2 à raison de 10 ng/ml à 10 μ g/ml, avantageusement de 20 ng/ml à 1 μ g/ml.

La culture des cellules précurseurs de cellules dendritiques est réalisée dans des récipients en plastique couramment utilisées dans ce domaine, tels que les flacons ou sacs de cultures cellulaires permettant l'adhérence des
5 cellules.

La culture est avantageusement réalisée dans des incubateurs dans les conditions normales de culture de cellules (stérilité ; CO₂ environ 5 % ; humidité environ 95 % et température environ 37°C).

Selon un autre aspect, l'invention a pour objet des cellules dendritiques qui
10 sont $\alpha\beta_3^-$; $\alpha\beta_5^+$; CCR5⁻ et CCR7⁺, c'est-à-dire qu'elles sont dépourvues des récepteurs $\alpha\beta_3^-$ et CCR5 et pourvues des récepteurs $\alpha\beta_5$ et CCR7.

Ces cellules dendritiques, qui peuvent être obtenues par le procédé défini précédemment, sont des cellules matures irréversibles. Elles sont utilisables comme agent d'immunothérapie dans toutes les thérapies cellulaires, telles que
15 par exemple le traitement des cancers ou des maladies infectieuses, virales ou parasitaires.

Ainsi l'invention a également pour objet l'utilisation des cellules dendritiques $\alpha\beta_3^-$; $\alpha\beta_5^+$; CCR5⁻ et CCR7⁺ pour la fabrication d'un agent d'immunothérapie utile pour le traitement de toute maladie impliquant le système
20 immunitaire.

En effet, avec les cellules dendritiques selon l'invention on peut réduire l'internalisation et la présentation de protéines xénogènes, allogènes ou autologues non identifiées et limiter ainsi les réponses immunitaires qui ne sont pas spécifiques aux antigènes tumoraux.

25 Les DC selon l'invention sont capables de capturer *in vivo* des antigènes tumoraux soit par endocytose des protéines soit par phagocytose des cellules apoptotiques.

Ces DC sont capables de migrer vers les ganglions lymphatiques afin de présenter les peptides dérivés d'antigènes dirigés contre les lymphocytes T.
30 Elles sont également capables de produire l'interleukine-12 favorisant une différenciation des cellules CD8⁺ naïves en des lymphocytes T cytotoxiques. Elles présentent un phénotype stable après retrait des cytokines utilisées lors des cultures *ex vivo*.

Le procédé de l'invention permet d'obtenir des cellules dendritiques
35 immatures et des cellules dendritiques matures.

En présence de GM-CSF et d'une interleukine, on obtient des cellules dendritiques immatures CD83⁺ CD14^{faible}. Ces DC expriment HLA-DR, CD80 et CD86 ainsi que des récepteurs endocytaires et phagocytaires, à savoir MR, CD36 et $\alpha\beta 5$.

- 5 De plus, ces DC immatures sont capables de phagocyter des cellules tumorales apoptotiques par la phagocytose des monocytes apoptotiques. Une stimulation de ces DC immatures avec du TNF- α plus GM-CSF et IL-4 pendant 2 jours supplémentaires conduit à l'obtention de cellules correspondant de façon phénotypique et fonctionnelle à des cellules dendritiques matures. Ces cellules
- 10 matures ont exprimé CD83 et des quantités plus élevées de HLA-DR, CD80 et CD86 par rapport aux DC immatures GM/IL-4.

Elles sont capables d'activer les lymphocytes T allogènes avec la même efficacité que les DC matures obtenues en présence de FCS.

- De plus, ces DC matures expriment également des récepteurs
- 15 endocytaires comme les récepteurs au mannose ou les récepteurs à la phagocytose de type $\alpha\beta 5$ et CD36. Ces DC matures ont toutefois une capacité pour endocyter le dextrane ou phagocyter les cellules tumorales apoptotiques plus faibles que les DC immatures dont elles sont issues.

- La réponse aux chémokines pour les DC obtenues selon l'invention, a été
- 20 modulée de façon similaire à celle des DC obtenues dans du milieu contenant du FCS. En fait, les DC immatures obtenues selon l'invention ont exprimé CCR5 et n'ont pas répondu à MIP-3 β . Ainsi, après injection in vivo, ces cellules devraient être piégées de préférence dans des sites inflammatoires où MIP-1 α , MIP-1 β ou RANTES sont produits (25). Après traitement avec du TNF- α , les DC selon
- 25 l'invention ont perdu l'expression de CCR5 et ont acquis la capacité de répondre à MIP-3 β . On peut penser qu'une proportion élevée de ces DC matures sera capable d'être piégée dans des zones de ganglions lymphatiques de cellules T où le MIP-3 β est produit et d'initier une réponse immunitaire efficace.

- De plus, on a montré que la PGE2 qui est connue pour accroître la
- 30 maturation des DC dans des milieux sans FCS (14,21), peut jouer un rôle sur la migration des DC. Dans les conditions de culture selon l'invention, la PGE2 n'a pas largement modifié le phénotype des DC produites avec GM/IL-4 et TNF, à l'exception d'un accroissement de l'expression de CD83, et n'a pas d'effet additif supplémentaire avec TNF- α pour l'activation des cellules T. Toutefois, la PGE2 a
- 35 accru la migration des DC en réponse à MIP-3 β . La migration des DC dans les organes lymphoïdes peut donc être sélective.

Afin d'induire la production des cellules T cytotoxiques anti-tumorales, les DC doivent être capables de diriger la différenciation des cellules T naïves vis-à-vis du sous-ensemble de type 1 exprimant IFN- γ et IL-2. L'IL-12 constitue la cytokine principale impliquée dans la polarisation de cellules TCD4+ vis-à-vis des cellules Th1. Dans le modèle de réponse des cellules T anti-EBV, il a été mis en évidence que l'expression de IL-10 par des lignées cellulaires lymphoblastoïdes est associée avec l'émergence des cellules T CD8+ de type 2 (32) qui produisent IL-4 et IL-10 et qui ne sont pas cytotoxiques (33). Au contraire, les cellules CD8+ de type 1 produisent de l'IFN- γ et de l'IL-2 et sont cytotoxiques. Ainsi, des DC produites *in vitro* à des fins de vaccination anti-tumorale doivent idéalement produire IL-12 et non IL-10. En effet, IL-10 possède un effet nocif supplémentaire sur la maturation des DC. En fait, les DC traitées avec IL-10 pendant la phase de maturation induisent l'anergie spécifique aux antigènes des cellules T CD4+ et CD8+ (25,34). Les DC obtenues selon l'invention, différentes de celles obtenues en présence de FCS (35,36), ont produit uniquement de faibles quantités de IL-12 mais des quantités importantes de IL-10 en réponse à la ligature à CD40, en accord avec les études montrant que les DC myéloïdes étaient capables de produire IL-10, en particulier en suivant la stimulation par CD40 (37,38).

Toutefois, on a montré que la maturation des DC induites par TNF- α a entraîné l'induction de la production de IL-12 et une inhibition dramatique de la synthèse de IL-10 après activation par CD40. Ainsi, les DC matures selon l'invention sont capables de déclencher la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T de type 1. L'addition de PGE2 a de plus inhibé la production de IL-10 mais également la production de IL-12 matures obtenues.

L'invention a également pour objet un procédé de traitement immunothérapeutique qui consiste à prélever à un patient à traiter des cellules mononuclées par cytophérèse après mobilisation par chimiothérapie et/ou avec un facteur de croissance cellulaire et éventuellement congélation/décongélation, à traiter lesdites cellules selon le procédé défini ci-dessus et à les activer au cours de l'étape 2) dudit procédé (étape de maturation) par des antigènes spécifiques selon les procédures habituelles bien connues de l'homme de métier, par exemple par endocytose et ensuite à réinjecter les cellules DC obtenues audit patient.

Avantageusement, ces cellules dendritiques peuvent être congelées après l'étape de maturation/activation selon les techniques habituelles sans modification substantielle de leurs propriétés.

Les DC selon l'invention conviennent en particulier pour les traitements par allogreffes ou autogreffes.

L'invention va être illustrée plus en détail par les exemples ci-après donnés à titre non limitatifs et par les figures qui représentent ci-après :

- la Figure 1 montre l'effet de la maturation des DC sur l'endocytose de FITC-dextran :

10 A) avec des DC obtenues par culture sur milieu X-VIVO 15-2 % HA en présence de GM-CSF et IL-4 ;

B) avec des DC obtenues par culture sur milieu X-VIVO 15-2 % HA en présence de GM-CSF, IL-4 et TNF- α ;

15 C) avec des DC obtenues par culture sur milieu X-VIVO 15-2 % HA en présence de GM-CSF, IL-4 et PGE 2.

Les courbes en pointillés correspondent au temps d'incubation des DC avec FITC-dextran de 7 minutes, les courbes en traits pleins à l'incubation pendant 15 minutes et les courbes en traits gras à l'incubation pendant 30 minutes ; sur l'axe des abscisses sont indiquées l'intensité de fluorescence et sur l'axe des ordonnées le nombre d'évènements ;

25 - la Figure 2 montre l'apoptose de cellules XG-1 par le cycloheximide (CHX) par mesure de la fluorescence des cellules colorées par l'Annexin-V FITC et par l'iodure de propidium (PI) ;

- la Figure 3 montre la phagocytose des cellules tumorales apoptotiques par les DC immatures et l'absence de phagocytose par les DC matures ;

30 - la Figure 4 montre l'effet de la maturation des DC sur l'expression de CCR5.

- la Figure 5 montre la migration des DC matures et la non-migration des cellules immatures en réponse à (ELC)/MIP-3 β .

35 - la Figure 6 montre l'activation des cellules T allogènes par les DC matures.

EXEMPLE 1 : Production des cellules dendritiques (DC)

On a recueilli des cellules de cytophérèse (AC) provenant de quatre patients présentant différents cancers pendant la mobilisation des précurseurs hématopoïétiques avec le cyclophosphamide et le facteur humain de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF, filgrastim ; NEUPOGEN, Amgen-Roche, Neuilly-sur-Seine, France). Chaque lot de cellules AC recueillies a été congelé dans de l'azote liquide puis décongelé et lavé à deux reprises en présence d'un chélateur du calcium et du magnésium. Chaque lot de cellules a ensuite été mis dans un flacon de culture cellulaire contenant du milieu X-VIVO 15 complémenté avec 2 % d'albumine humaine (X-VIVO-2% HA) et on a laissé les cellules adhérer sur la surface du flacon de culture pendant 2 h. On a éliminé les cellules qui n'ont pas adhéré et on a cultivé les cellules qui ont adhéré en présence de 100 ng/ml de GM-CSF (Leucomax, Sandoz, Basel, Suisse) et 25 ng/ml de IL-4 (R&D Systems, Minneapolis, MN) pendant 7 jours dans du milieu X-VIVO 15 complémenté avec 2 % de HA. A des fins de comparaison, on a également cultivé des cellules qui ont adhéré en présence de 100 ng/ml de GM-CSF et 25 ng/ml de IL-4 soit dans du milieu RPMI 1640 complémenté avec 10 % de FCS (milieu de référence), soit dans du milieu X-VIVO 15 seul ou dans du milieu X-VIVO 15 complémenté avec 5 % de SAB, 5 % de sérum autologue ou 5 % de plasma autologue. Dans chaque cas, on a ajouté les deuxième et quatrième jours du milieu frais contenant GM-CSF et IL-4. Après 5 jours de culture, on a ajouté du milieu contenant GM-CSF et IL-4 avec du TNF- α (R&D Systems) à 20 ng/ml ou du TNF- α à 20 ng/ml et du PGE2 (Sigma Chemical, St Louis, MO) à 1 μ g/ml. Après 48 h, on a recueilli les cellules et on les a comptées. Le rendement en cellules est donné dans le tableau I où on constate que le rendement en cellules obtenu en présence de GM-CSF et de IL-4 a atteint 12 % avec du sérum AB, 18 % avec du plasma autologue, 22 % avec du sérum autologue et 16 % avec du HA. Le milieu X-VIVO 15-2 % de HA complémenté avec GM-CSF et IL-4 est le milieu le plus efficace pour obtenir des DC immatures de qualité clinique CD14^{-faible} CD83⁻ HLA-DR⁺⁺ exprimant de grandes quantités de CD80 et CD86.

Comme le montrent également les résultats du tableau I, le sérum AB, le plasma autologue et le sérum autologue ont été moins actifs que HA pour l'obtention *in vitro* des DC matures.

Etant donné qu'une cytophérèse de 5 heures permet en général de récupérer 40 à 50 x 10⁹ cellules mononuclées, on a donc pu obtenir dans les conditions opératoires de l'invention 6 à 8 x 10⁹ DC de façon reproductible. Cette quantité de cellules est suffisante pour permettre au moins 6 vaccinations avec 10⁹ DC.

La culture de cellules sur milieu X-VIVO 15 seul a été réalisée à partir des cellules de cytophérèse de 8 donneurs mobilisées par le facteur de croissance hématopoïétique (G-CSF) ou par le cyclophosphamide et le facteur de croissance hématopoïétique.

Pour 5 des 8 donneurs, les cellules cultivées en milieu X-VIVO 15 en présence de GM-CSF et d'IL-4 pendant 7 jours avaient une viabilité inférieure à 65% ce qui n'a pas permis d'analyser leur phénotype et leurs fonctions contrairement aux cellules des mêmes donneurs cultivées en présence de X-VIVO 15-2% d'albumine humaine, GM-CSF et IL-4 pendant 7 jours.

Le milieu X-VIVO 15 seul ne permet pas de générer de façon reproductible des cellules dendritiques immatures. L'addition de 2% d'albumine humaine a permis dans tous les cas une génération de cellules dendritiques parfaitement viables et fonctionnelles et irréversibles.

EXEMPLE 2 : Analyse phénotypique par cytométrie de flux des cellules DC

Pour caractériser le phénotype des DC obtenues selon l'exemple 1, on a déterminé le pourcentage de cellules exprimant CD14, HLADR, CD83, CD80 et CD86 par cytométrie de flux (FACS) en utilisant les anticorps monoclonaux suivants : CD1a-PE, CD14-PE, CD36-FITC, CD80-PE, CD83-PE, HLA-DR-FITC (Immunotech, Marseille, France); les anticorps monoclonaux CCR5-PE, CD51/CD61-FITC, CD86-FITC, MR-PE (Pharmingen, San Diego, CA) et les anticorps murins IgG appariés suivant l'isotype (Immunotech).

Le phénotype total des DC obtenus selon l'exemple 1 est similaire à celui des DC immatures obtenues par culture dans le milieu RPMI en présence de FCS (tableau I). En utilisant le milieu X-VIVO 15 complété avec du sérum AB, du plasma autologue ou du sérum autologue, le pourcentage des cellules CD14⁺ a été grandement augmenté (jusqu'à 80 % dans du X-VIVO 15-sérum AB) et les cellules résultantes ont exprimé une densité plus faible de HLA classe II et de molécules costimulatrices. En revanche, selon le procédé de l'invention, c'est-à-dire avec le milieu X-VIVO 15-2 % de HA, on a pu obtenir un nombre élevé de DC (CD14⁺, HLA-DR⁺⁺, CD80⁺⁺, CD86⁺⁺) sans addition de protéines

xénogènes, de protéines allogènes, d'anticorps humains ou d'antigènes tumoraux autologues non identifiés.

Des résultats similaires ont été obtenus avec des AC provenant de quinze donneurs, cultivées dans les conditions opératoires de l'invention, c'est-à-dire dans un milieu X-VIVO 15 complémenté avec 2 % d'albumine humaine en présence de GM-CSF, IL-4 et TNF- α avec ou sans PGE2. Ces résultats figurent dans le tableau II.

Le CD83, marqueur spécifique des DC matures, a pu être détecté après 24 h de culture en présence de TNF- α et a atteint un maximum d'expression en 48 h. La combinaison de PGE2 et TNF- α a induit l'expression de CD83 jusqu'à 83 % de cellules par rapport à 64 % avec du TNF- α seul ($p = 0,007$) (tableau II). Les PGE2 ont également coopéré avec le TNF- α pour la régulation en amont de CD80 et CD86 sur les DC (tableau I et tableau II).

Dans une autre série d'expériences, on a opéré dans les mêmes conditions que ci-dessus sauf que le cinquième jour, on a ajouté la PGE2 sans TNF- α .

Le pourcentage des cellules CD14⁺ obtenues en présence de GM-CSF + IL-4 + PGE2 était supérieur à celui obtenu en présence de GM-CSF et IL-4 seuls, ce qui suggère que le PGE2, lorsqu'il est utilisé sans TNF- α induit la réversion d'au moins certaines DC immatures en cellules de type macrophage bien que le GM-CSF et IL-4 étaient continuellement présents dans le milieu de la culture.

De la même façon, quand les DC immatures, obtenues dans du X-VIVO 15-2 % de HA complémenté avec GM-CSF et IL-4, ont été récoltées le septième jour, lavées de façon extensive et cultivées dans le milieu de culture sans cytokine pendant 3 jours supplémentaires, elles ont de nouveau adhéré au sac de culture et ont exprimé CD14. Il s'agit là d'une réversion de ces DC immatures en cellules de type macrophage. En revanche, la morphologie cellulaire et le phénotype cellulaire des DC matures, produites par addition de TNF- α seul ou de TNF- α + PGE2, n'ont pas été affectés de façon marquée après retrait des cytokines, ce qui indique que la maturation a eu lieu de manière irréversible.

EXEMPLE 3 : Endocytose par MR

On a étudié l'endocytose au niveau cellulaire des DC obtenues par culture de cellules AC mobilisées selon le traitement indiqué dans l'exemple 1 dans du milieu X-VIVO 15 - 2 % HA en présence de GM-CSF et d'IL-4 pendant cinq

jours. Le cinquième jour, on a ajouté du milieu frais contenant GM-CSF et IL-4, ou GM-CSF, IL-4 et TNF- α ou GM-CSF et IL-4, TNF- α et PGE2. Le septième jour, on a déterminé l'expression de MR, CD36, $\alpha v\beta 3$ et $\alpha v\beta 5$ par la méthode d'analyse FACS.

- 5 Pour déterminer l'expression du marqueur MR on a opéré selon la méthode décrite par Tarte et al. (27) en utilisant du FITC-dextran pouvant fixer la lysine, MM = 40 000 (Molecular Probes Inc., Eugene, OR). On a recueilli les DC immatures et matures le septième jour et on les incubées à 37°C pendant 7, 15 et 30 min ou à 4°C pendant 30 min (fixation de fond) avec 1 mg/ml de FITC-dextran. On a ensuite lavé les DC avec du PBS froid complété avec 1 % de FCS et 0.02 de NaN₃ et on a analysé la fluorescence avec un appareil FACScan.

La moyenne du pourcentage de cellules positives obtenues par culture des AC de six donneurs est indiquée dans le tableau III.

- 15 Ces résultats montrent que les DC immatures obtenues dans du X-VIVO 15-2 % de HA par culture de 7 jours avec GM-CSF et IL-4 ont largement exprimé des MR et cette expression a significativement diminué de plus de 50 % lors de la maturation des DC induite soit par TNF- α seul ($p = 0,03$), soit par TNF- α + PGE2 ($p = 0,03$).

- 20 L'endocytose du FITC-dextran par les cellules matures obtenues selon l'invention avec du TNF- α ou du TNF- α + PGE 2 a profondément diminué par rapport aux DC immatures comme cela est montré par la Figure 1.

EXEMPLE 4 : Induction de l'apoptose dans les cellules plasmatiques malignes

- 25 Pour tester le potentiel phagocytaire des DC obtenues selon le procédé de l'invention, on a utilisé des cellules tumorales apoptotiques.

- 30 XG-1 est une lignée cellulaire de myélome multiple dont les caractéristiques ont été décrites en détail par Zhang et al. (28). On a incubé des cellules XG-1 ($2,5 \times 10^5$ /ml) avec 4 μ m/ml de cycloheximide (CHX) dans du milieu RPMI 1640-10 % de FCS complété avec 3 ng/ml de IL-6 à 37°C. On a enregistré la cinétique de l'apoptose cellulaire en utilisant une double coloration avec le colorant connu sous la dénomination Annexin-V FITC (Boehringer Mannheim, Meylan, France) et de l'iodure de propidium (PI) (Sigma). Dans un premier temps, les cellules apoptotiques ont été colorées uniquement par l'Annexin-V (Annexin-V⁺/PI⁻) tandis que dans un deuxième temps, les cellules
- 35 nécrotiques ont incorporé également du PI en raison d'une perte de l'intégrité de leur membrane (Annexin-V⁺/PI⁺). Après traitement avec le CHX, on a lavé les

cellules tumorales à trois reprises dans du X-VIVO 15-2 % de HA avant de les mettre en coculture avec des DC obtenues selon le mode opératoire décrit à l'exemple 1.

Les résultats obtenus sont reportés sur la figure 2. Ces résultats montrent qu'après 6 h de culture avec 4 µg/ml de CHX, 60 % des cellules de myélome XG-1 ont montré des caractéristiques de mort cellulaire apoptotique précoce, c'est-à-dire une liaison de Annexin-V mais une non-incorporation de PI.

EXEMPLE 5 : Phagocytose des cellules apoptotiques

La phagocytose des cellules apoptotiques constitue un autre mode d'entrée des antigènes et joue un rôle majeur dans le phénomène d'amorçage croisé. Récemment, plusieurs récepteurs phagocytaires ont été identifiés sur les DC obtenues en présence des sérums humains et il a été montré qu'un milieu conditionné pour des monocytes (MCM), qui conduit à une maturation des DC irréversible, régule en aval leur expression (6).

On a teinté en vert les DC immatures et matures en utilisant du PKH67-GL (Sigma) et on les a cultivées pendant 2 h pour permettre la libération du colorant non lié. On a teinté en rouge des cellules XG-1 en utilisant du PKH26-GL (Sigma) selon les instructions du fabricant avant leur induction pour subir l'apoptose par CHX pendant 6 à 8 h. Ensuite, on a cocultivé les cellules XG-1 teintées en rouge avec des DC immatures ou matures teintées en vert dans un rapport de 1:1 dans du X-VIVO 15-2 % de HA selon le protocole décrit par Albert et al. (6). Après 90 min à 37°C, on a analysé les fluorescences vertes et rouges avec un appareil FACScan. Dans les expériences de blocage, on a co-incubé les cellules XG-1 et les DC à 4°C.

Les marqueurs CD36, $\alpha\beta 3$ et $\alpha\beta 5$ ont été déterminés selon la méthode par marquage par anticorps monoclonaux et cytométrie de flux.

Pour la coloration de $\alpha\beta 5$, on a tout d'abord incubé les cellules avec un anticorps mAb primaire $\alpha\beta 5$ (Chemicon Int, Temecula, CA), puis avec un anticorps de chèvre anti-Ig de souris conjugué à FITC (Immunotech). On a réalisé les analyses avec un appareil FACScan (Becton Dickinson).

Les données provenant d'une expérience représentative parmi 3 sont représentées sur la figure 3. Plus d'un tiers des DC immatures ont englouti des XG-1 apoptotiques après 90 min de coculture. Seuls 10 à 12 % des DC immatures ont été teintées deux fois après coculture avec des cellules XG-1 non-apoptotiques. La phagocytose des cellules tumorales par des DC immatures

a été confirmée visuellement sur des cytoplines de cocultures teintées. La phagocytose a été complètement bloquée à basse température (figure 3). L'induction de la maturation des DC a produit une diminution de l'activité phagocytaire. En effet, seuls 12 % des DC matures obtenues après addition de

5 TNF- α ont internalisé les XG-1 apoptotiques après 90 min de coculture (figure 3). Une même diminution de la phagocytose a été obtenue avec des DC matures obtenues avec TNF- α + PGE2 (figure 3).

Dans les conditions de l'invention, les DC immatures ont exprimé des quantités élevées de CD36 et d'intégrine $\alpha\beta 5$; en revanche l'intégrine $\alpha\beta 3$ n'a

10 pas été détectée comme le montrent les résultats consignés dans le tableau III. Ces résultats montrent également qu'en présence de TNF- α , les expressions de CD36 et $\alpha\beta 5$ ont été significativement diminuées respectivement de plus d'un demi ($p = 0,002$) et de 20-35 % ($p = 0,03$). Le PGE2 n'a pas eu d'effet supplémentaire avec le TNF- α pour la diminution de l'expression des récepteurs

15 phagocytaires.

EXEMPLE 6 : Réponse aux chémokines des DC

On a répété l'opération avec six donneurs différents et on a mesuré l'intensité moyenne de fluorescence (MFI). Les résultats obtenus figurent dans le

20 tableau 4.

1) détection du récepteur CCR5

Dans ce test, on a utilisé l'anticorps monoclonal anti-CCR5 (Pharmingen, San Diego, CA, USA) pour détecter le récepteur CCR5 qui est un récepteur pour les chémokines inflammatoires.

25 On a incubé les cellules DC matures ou immatures obtenues dans le milieu X-VIVO 15 - 2 % HA avec ledit anticorps marqué et on a mesuré l'expression de CCR5 pour un donneur. Les résultats sont rassemblés dans les figures 4a, 4b et 4c.

Dans cet exemple, on a recherché la présence du CCR5 sur les DC

30 immatures et les DC matures produites dans du milieu X-VIVO 15 - 2 % HA.

Le CCR5, a été détectable sur les DC immatures produites dans du milieu X-VIVO 15-2 % HA mais son expression a été significativement réduite par une incubation de 48 h avec du TNF- α ($p = 0,03$). Le PGE2 n'a pas induit de diminution significative supplémentaire (figure 4) ($p = 0,25$).

2) détection du récepteur CCR7

Comme aucun anticorps monoclonal n'était disponible pour mesurer l'expression de CCR7, on a testé la réponse des DC à MIP-3 β dans un essai de chimiotactisme.

- 5 On a introduit les DC immatures et matures (2×10^5 cellules) dans 100 μ l de RPMI-1 % de HA dans la chambre supérieure d'un dispositif de séparation de cellules constitué de deux chambres de culture cellulaire (une chambre inférieure et une chambre supérieure séparées par un filtre ayant des pores de 5 μ m permettant le passage des cellules migratrices (dispositif Transwell de Costar,
- 10 Cambridge, MA). Dans la chambre inférieure, on a introduit 600 μ l de ELC/MIP-3 β dilués à 100 ng/ml dans le même milieu. Après une incubation de 4 h à 37°C, on a recueilli les cellules qui ont migré dans la chambre inférieure et on a comptées au microscope. On a exprimé les résultats par le pourcentage des cellules d'entrée qui ont migré dans la chambre inférieure (pourcentage des
- 15 cellules migratrices). La migration des DC provenant d'un donneur en l'absence et en présence de MIP-3 β est représentée sur la figure 5A et les résultats obtenus avec les DC issues d'AC de 6 donneurs avec MIP-3 β sont consignées sur la figure 5B. Les DC immatures cultivées avec GM-CSF et IL-4 n'ont pas répondu à MIP-3 β (pourcentage moyen de cellules qui ont migré : 0,7 %, n=6).
- 20 L'addition de TNF- α au cinquième jour a accru significativement la réponse des DC ($p = 0,002$) avec une moyenne de 14,2 % de cellules en migration ($n = 6$). Le PGE2 a agi de façon synergique avec TNF- α puisque 31 à 67 % (moyenne : 48,8 %, $n = 6$) des DC maturées avec TNF- α + PGE2 ont migré jusqu'à la chambre inférieure du dispositif transwell pendant une durée d'incubation de 4 h
- 25 à 37°C ($p = 0,002$) par rapport aux DC maturées avec du TNF- α . Ceci a été associé à une légère augmentation de la migration spontanée des DC (une moyenne de 7 % des DC d'entrée a été trouvée dans la chambre inférieure en l'absence de MIP-3 β).

30 EXEMPLE 7 : Analyse des cytokines

- On a récolté les DC immatures et matures obtenues après 7 jours de culture dans du X-VIVO 15-2 % de HA, on les a lavées et on les a étalées à raison de 4×10^5 /ml dans du RPMI 1640-5 % de FCS avec ou sans cellules L transfectées par 10^5 /ml de CD40L, (fourni par le Docteur Sem Saeland,
- 35 Schering-Plough, Dardilly, France). Lorsque cela était indiqué, on a ajouté de l'IFN- γ humain recombinant (1000 U/ml, R&D Systems). On a recueilli les

surnageants 24 h à 30 h après stimulation et on les a stockés à -70°C. On a mesuré les quantités de IL-10 et p70 IL-12 par ELISA selon le mode opératoire du fabricant (R&D Systems).

Les DC immatures obtenues avec du GM-CSF/IL-4 n'ont pas produit p70 IL-12 mais ont produit des quantités très élevées de IL-10 après déclenchement par CD40 (tableau 5). L'addition de IFN- γ avec la stimulation par CD40 a entraîné une diminution de 30 fois de la production d'IL-10 par des DC immatures activées par CD40. L'induction de la maturation des DC avec du TNF- α a entraîné une diminution dramatique de la production de IL-10 induite par CD40 (réduction moyenne de 10 fois) en association avec l'induction de l'expression de IL-12. L'addition de IFN- γ a encore inhibé la production de IL-10 par des DC matures. Ceci est en accord avec les rapports précédents montrant que l'IFN- γ pouvait être un cofacteur pour la production de IL-12 induite par CD40 (29,30). Toutefois, pour l'échantillon testé des trois autres patients, l'IFN- γ a réduit la production de IL-12 par DC obtenue en présence de GM-CSF/IL-4 et TNF- α . Enfin, l'induction d'une DC totalement mature avec du TNF- α et PGE2 a entraîné une production réduite de IL-10 et IL-12 après stimulation par CD40 par rapport à TNF- α seul.

EXEMPLE 8 : Réaction des lymphocytes mixtes allogènes (MLR)

On a purifié des lymphocytes T non activés (HLA DR⁻) à partir de sang périphérique de volontaires en bonne santé par deux cycles de sélection négative en utilisant des microbilles revêtues de CD14 et de CD19 (DynaI, Oslo, Norvège), suivi par un cocktail d'anticorps mAbs CD16, CD56 et HLA-DR (Immunotech) et de microbilles d'anti-Ig de souris de chèvre (DynaI). La pureté des cellules T CD3⁺ était supérieure à 97 %. On a ajouté des nombres progressifs de DC traitées par de la mitomycine (50 μ g/ml) à $1,5 \times 10^5$ cellules T allogènes dans 200 μ l de RPMI-5 % de SAB. Après 5 jours de culture, on a mesuré la prolifération des cellules T par incorporation de thymidine tritiée (1 μ Ci/puits) pendant les 12 dernières heures. On a exprimé les résultats par les coûts moyens par minute (cpm) \pm l'écart type déterminé dans des puits de culture sextuplés.

Les résultats de la figure 6 montrent que la maturation des DC obtenues dans du X-VIVO 15-2 % de HA les a transformées en stimulateurs des cellules T allogéniques aussi puissants que les DC matures produites dans du RPMI-10 % de FCS. Le TNF- α seul a donné les mêmes résultats que l'association de TNF- α et PGE2.

Références

1. Hart, D. N. J. 1998. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 90:3245.
- 5 2. Banchereau, J. and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245.
- 10 3. Fanger, N. A., D. Voigtlaender, C. Liu, S. Swink, K. Wardwell, J. Fisher, R. F. Graziano, L. C. Pfefferkorn, and P. M. Guyre. 1997. Characterization of expression, cytokine regulation, and effector function of the high affinity IgG receptor Fc gamma RI (CD64) expressed on human blood dendritic cells. *J. Immunol.* 158:3090.
- 15 4. Fanger, N. A., K. Wardwell, L. Shen, T. F. Tedder, and P. M. Guyre. 1996. Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J. Immunol.* 157:541.
- 20 5. Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli, and A. Lanzavecchia. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products [see comments]. *J Exp. Med.* 182:389.
- 25 6. Albert, M. L., S. F. A. Pearce, L. M. Francisco, B. Sauter, P. Roy, R. L. Silverstein, and N. Bhardwaj. 1998. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes [In Process Citation]. *J. Exp. Med.* 188:1359.
- 30 7. Sozzani, S., P. Allavena, G. D'Amico, W. Luini, G. Bianchi, M. Katakura, T. Imai, O. Yoshie, R. Bonecchi, and A. Mantovani. 1998. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J. Immunol.* 161:1083.
- 35

8. Sallusto, F., P. Schaerli, P. Loetscher, C. Schaniel, D. Lenig, C. R. Mackay, S. Qin, and A. Lanzavecchia. 1998. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.* 28:2760.
- 5
9. Lin, C. L., R. M. Suri, R. A. Rahdon, J. M. Austyn, and J. A. Roake. 1998. Dendritic cell chemotaxis and transendothelial migration are induced by distinct chemokines and are regulated on maturation. *Eur. J. Immunol.* 28:4114.
- 10
10. Tarte, K. and B. Klein. 1999. Dendritic-based vaccine: a promising approach for cancer immunotherapy. *Leukemia* 13:653.
11. Nestle, F. O., S. Alijagic, M. Gilliet, Y. Sun, S. Grabbe, R. Dummer, G. Burg, and D. Schadendorf. 1998. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat. Med.* 4:328.
- 15
12. Romani, N., D. Reider, M. Heuer, S. Ebner, E. Kampgen, B. Eibl, D. Niederwieser, and G. Schuler. 1996. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J. Immunol. Methods* 196:137.
- 20
13. Reddy, A., M. Sapp, M. Feldman, M. Subklewe, and N. Bhardwaj. 1997. A monocyte conditioned medium is more effective than defined cytokines in mediating the terminal maturation of human dendritic cells. *Blood* 90:3640.
- 25
14. Jonuleit, H., U. Kuhn, G. Muller, K. Steinbrink, L. Paragnik, E. Schmitt, J. Knop, and A. H. Enk. 1997. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur. J. Immunol.* 27:3135.
- 30
15. Murphy, G., B. Tjoa, H. Ragde, G. Kenny, and A. Boynton. 1996. Phase I clinical trial: T-cell therapy for prostate cancer using autologous dendritic cells pulsed with HLA-A0201-specific peptides from prostate-specific membrane antigen. *Prostate* 29:371.
- 35

16. Tjoa, B. A., S. J. Simmons, V. A. Bowes, H. Ragde, M. Rogers, A. Elgamal, G. M. Kenny, O. E. Cobb, R. C. Ireton, M. J. Troychak, M. L. Salgaller, A. L. Boynton, and G. P. Murphy. 1998. Evaluation of phase I/II clinical trials in prostate cancer with dendritic cells and PSMA peptides. *Prostate* 36:39.
- 5
17. Thurner, B., C. Roder, D. Dieckmann, M. Heuer, M. Kruse, A. Glaser, P. Keikavoussi, E. Kampgen, A. Bender, and G. Schuler. 1999. Generation of large number of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J. Immunol. Methods* 223:1.
- 10
18. Soruri, A., A. Fayyazi, R. Gieseler, T. Schlott, T. M. Runger, C. Neumann, and J. H. Peters. 1998. Specific autologous anti-melanoma T cell response in vitro using monocyte-derived dendritic cells. *Immunobiology* 198:527.
- 15
19. Anton, D., S. Dabadghao, K. Palucka, G. Holm, and Q. Yi. 1998. Generation of dendritic cells from peripheral blood adherent cells in medium with human serum. *Scand. J. Immunol.* 47:116.
- 20
20. Kim, C. J., T. Prevette, J. Cormier, W. Overwijk, M. Roden, N. P. Restifo, S. A. Rosenberg, and F. M. Marincola. 1997. Dendritic cells infected with poxviruses encoding MART-1/Melan A sensitize T lymphocytes in vitro. *J. Immunother.* 20:276.
- 25
21. Rieser, C., G. Bock, H. Klocker, G. Bartsch, and M. Thurnher. 1997. Prostaglandin E2 and tumor necrosis factor alpha cooperate to activate human dendritic cells: synergistic activation of interleukin 12 production. *J. Exp. Med.* 186:1603.
- 30
22. Holtl, L., C. Rieser, C. Papesh, R. Ramoner, G. Bartsch, and M. Thurnher. 1998. CD83+ blood dendritic cells as a vaccine for immunotherapy of metastatic renal-cell cancer [letter] [In Process Citation]. *Lancet* 352:1358.

23. Apostolopoulos, V., C. Osinski, and I. F. McKenzie. 1998. MUC1 cross-reactive Gal alpha(1,3)Gal antibodies in humans switch immune responses from cellular to humoral [see comments]. *Nat. Med.* 4:315.
- 5 24. Abdel-Wahab, Z., P. DeMatos, D. Hester, X. D. Dong, and H. F. Seigler. 1998. Human dendritic cells, pulsed with either melanoma tumor cell lysates or the gp100 peptide(280-288), induce pairs of T-cell cultures with similar phenotype and lytic activity. *Cell Immunol.* 186:63.
- 10 25. Morse, M. A., R. E. Coleman, G. Akabani, N. Niehaus, D. Coleman, and H. K. Lyerly. 1999. Migration of human dendritic cells after injection in patients with metastatic malignancies. *Cancer Res* 59:56.
- 15 26. Tarte, K., S. J. Olsen, Z. Y. Lu, E. Legouffe, J. F. Rossi, Y. Chang, and B. Klein. 1998. Clinical grade functional dendritic cells from patients with multiple myeloma are not infected with Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Blood* 91:1852.
- 20 27. Tarte, K., Z. Y. Lu, G. Fiol, E. Legouffe, J. F. Rossi, and B. Klein. 1997. Generation of virtually pure and potentially proliferating dendritic cells from non-CD34 apheresis cells from patients with multiple myeloma. *Blood* 90:3482.
- 25 28. Zhang, X. G., J. P. Gaillard, N. Robillard, Z. Y. Lu, Z. J. Gu, M. Jourdan, J. M. Boiron, R. Bataille, and B. Klein. 1994. Reproducible obtaining of human myeloma cell lines as a model for tumor stem cell study in human multiple myeloma. *Blood.* 83:3654.
- 30 29. Kalinski, P., J. H. N. Schuitemaker, C. M. U. Hilkens, E. A. Wierenga, and M. L. Kapsenberg. 1999. Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN-g and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells. *J. Immunol.* 162:3231.

30. Snijders, A., P. Kalinski, C. M. U. Hilkens, and M. L. Kapsenberg. 1998. High-level IL-12 production by human dendritic cells requires 2 signals . *Int. Immunol.* 10:1593.
- 5 31. Liu, P., M. Rowley, and B. Van Ness. 1996. Wildtype RB and p53 can suppress autocrine IL-6 production and proliferation of U266 myeloma cells. *Blood* 88:389.
- 10 32. Nazaruk, R. A., R. Rochford, M. V. Hobbs, and M. J. Cannon. 1998. Functional diversity of the CD8+ T-cell response to Epstein-Barr Virus (EBV): Implication for the pathogenesis of EBV-associated lymphoproliferative disorders. *Blood* 91:3875.
- 15 33. Carter, L. and R. W. Dutton. 1996. Type 1 and type 2: a fundamental dichotomy for all T-cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* 8:336.
- 20 34. Steinbrink, K., H. Jonuleit, G. Muller, G. Schuler, J. Knop, and A. H. Enk. 1999. Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8+ T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood* 93:1634.
- 25 35. Kalinski, P., J. H. N. Schuitemaker, C. M. U. Hilkens, and M. L. Kapsenberg. 1998. Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. *J. Immunol.* 161:2804.
- 30 36. Cella, M., D. Scheidegger, K. Palmer Lehmann, P. Lane, A. Lanzavecchia, and G. Alber. 1996. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J. Exp. Med.* 184:747.

37. Rissoan, M-C., V. Soumelis, N. Kadowaki, G. Grouard, F. Briere, R. de Waal Malefyt, and Y. J. Liu. 1999. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 283:1183.
- 5 38. Zhou, L. J. and T. F. Tedder. 1995. A distinct pattern of cytokine gene expression by human CD83+ blood dendritic cells. *Blood* 86:3295.

Tableau I
Analyse phénotypique des DC

Milieu	Cytokines	Rendement (%)	Viabilité (%)	Moyenne des pourcentages de cellules positives (IMF)				
				CD14	HLA-DR	CD83	CD80	CD86
RPMI-FCS	GM/IL-4	9	93	10 (32)	100 (180)	3	80 (72)	82 (53)
	GM/IL-4/TNF	10	94	4	100 (465)	86 (47)	98 (120)	90 (126)
	GM/IL-4/TNF/PGE2	10	95	3	100 (417)	94 (65)	98 (190)	100 (188)
XV-sérum AB	GM/IL-4	12	92	80 (52)	100 (115)	0	77 (32)	90 (22)
	GM/IL-4/TNF	14	90	25 (69)	100 (224)	25 (40)	95 (60)	85 (50)
	GM/IL-4/TNF/PGE2	13	86	40 (50)	100 (173)	52 (80)	90 (60)	100 (95)
XV-plasma autologue	GM/IL-4	18	90	40 (35)	100 (90)	0	25 (30)	90 (65)
	GM/IL-4/TNF	19	95	20 (29)	100 (125)	20 (55)	35 (42)	90 (110)
	GM/IL-4/TNF/PGE2	23	92	12 (60)	100 (145)	80 (65)	80 (58)	110 (160)
XV-sérum autologue	GM/IL-4	22	89	50 (35)	100 (95)	9 (12)	28 (26)	85 (68)
	GM/IL-4/TNF	25	90	26 (66)	100 (120)	17 (25)	39 (33)	90 (92)
	GM/IL-4/TNF/PGE2	23	93	40 (70)	100 (115)	59 (66)	72 (68)	95 (150)
XV-HA	GM/IL-4	16	89	21 (13)	100 (172)	0	82 (46)	85 (80)
	GM/IL-4/TNF	16	94	5	100 (270)	55 (43)	100 (110)	95 (97)
	GM/IL-4/TNF/PGE2	20	90	3	100 (251)	85 (66)	100 (136)	100 (133)

XV-HA = milieu X-VIVO 15-2 % d'albumine humaine

GM = facteur GM-CSF

Tableau II
Analyse phénolotypique de DC obtenues par culture dans du milieu
XV-HA complémenté avec GM-CSF, IL-4 et TNF- α avec ou sans PGE2

5

Cytokines	CD14	HLA-DR	CD83	CD80	CD86
GM/IL-4/TNF	2,6 \pm 8,2	100	64 \pm 19	100	100
Moyenne des %*** \pm SD	-	299 \pm 183	44 \pm 7	140 \pm 49	251 \pm 211
GM/IL-4/TNF/PGE2	1,5 \pm 4	100	83 \pm 12**	100	100
Moyenne des %*** \pm SD	-	265 \pm 124	61 \pm 25*	190 \pm 85	345 \pm 271

* $p < 0,01$ par comparaison aux cellules cultivées avec GM/IL-4/TNF

** $p < 0,05$ par comparaison aux cellules cultivées avec GM/IL-4/TNF

*** moyenne des % = moyenne des % de cellules positives

10 GM = facteur GM-CSF

Tableau III
Profil des récepteurs des DC

Conditions de culture	Moyenne des % de cellules positives (IFM)			
	MR	CD36	α vb3	α vb5
XV-HA GM/IL-4	98 (233)	88 (89)	0	87 (43)
XV-HA GM/IL-4/TNF	80 (95)*	37 (47)**	0	68 (32)*
XV-HA GM/IL-4/TNF /PGE2	74 (91)*	25 (33)**	0	58 (36)*

5

XV-HA = milieu X-VIVO 15 - 2 % HA

* $p < 0,01$ par comparaison aux cellules cultivées avec GM/IL-4

** $p < 0,05$ par comparaison aux cellules cultivées avec GM/IL-4

Tableau IV : CCR5

Conditions de culture	GM+IL-4	GM+IL-4+TNF	GM+IL-4+TNF+PGE2
Donneur 1	8	4	3
Donneur 2	12	6	5
Donneur 3	14	6	5
Donneur 4	10	5	5
Donneur 5	10	4	4
Donneur 6	11	6	6
IFM	10,8	5,2	4,7
	p = 0,03		p = 0,25

Tableau V
Production de cytokines par les DC

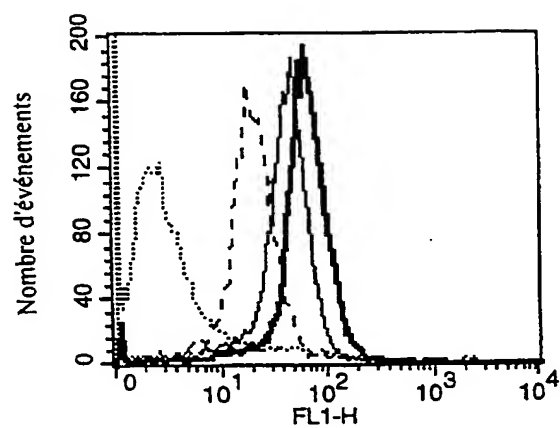
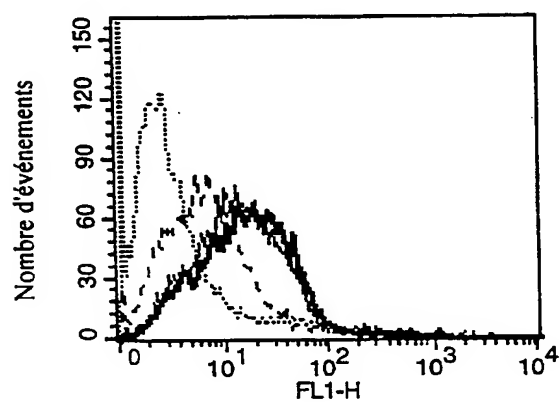
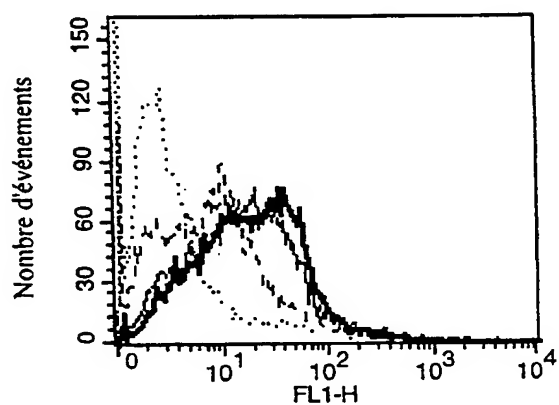
Conditions de culture	Production de cytokines (pg/ml)					
	sans stimulation		stimulation avec CD40		stimulation avec CD 40 + IFN- γ	
	IL-10	IL-12	IL-10	IL-12	IL-10	IL-12
XV-HA GM/IL-4	25 \pm 9 (16-35)	0	1619 \pm 529 (1105-2360)	5,5 \pm 6,3 (0-11)	50 \pm 57 (14-115)	158 \pm 274 (0-476)
XV-HA GM/IL-4/TNF	0	0	137 \pm 104 (62-285)	84 \pm 23 (55-105)	7 \pm 7 (0-21)	299 \pm 518 (0-898)
XV-HA GM/IL-4/TNF/PGE2	0	0	64 \pm 61 (0-145)	7,2 \pm 8,8 (0-18)	0	16 \pm 29 (0-50)

REVENDICATIONS

1. Procédé pour l'obtention de cellules dendritiques, caractérisé en ce qu'il
5 consiste :
 - 1) à cultiver, pendant 4 à 6 jours, des cellules mononuclées issues de
cytaphérèse après mobilisation, dans un milieu exempt de sérum
complémenté avec de l'albumine humaine en présence d'un facteur
stimulant les colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF) et d'une
10 interleukine (IL) bloquant la différenciation vers la voie macrophagique ;
 - 2) à ajouter au milieu de culture du TNF- α et éventuellement un médiateur
inflammatoire et à poursuivre la culture pendant environ 1 à 4 jours
supplémentaires ;
 - 3) à récupérer les cellules dendritiques ainsi formées.
- 15 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la culture de l'étape
1) est réalisée pendant 5 jours et celle de l'étape 2) pendant 2 jours ;
3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que
l'interleukine est l'interleukine-4 ou l'interleukine-13.
4. Procédé selon l'une quelconque des revendication 1 à 3, caractérisé en ce
20 que le médiateur inflammatoire est le facteur de nécrose tumorale alpha
(TNF- α).
5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce
que le médiateur inflammatoire est le facteur de nécrose tumorale alpha
(TNF- α) et la prostaglandine E2 (PGE2).
- 25 6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce
que les cellules mononuclées sont des cellules mononuclées obtenues par
cytaphérèse après mobilisation par chimiothérapie et/ou par au moins un
facteur de croissance cellulaire.
7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce
30 que le GM-CSF, l'interleukine et le TNF- α sont chacun utilisés à raison de 1
à 1000 ng/ml de milieu.
8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce
que l'albumine humaine est utilisée à raison de 1 à 2 % (poids/volume de
milieu).

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que l'albumine humaine est utilisée à raison de 2 % (poids/volume de milieu).
- 5 10. Cellules dendritiques irréversibles caractérisées en ce qu'elles sont $\alpha\text{v}\beta 3^-$, $\alpha\text{v}\beta 5^+$, CCR5⁻ et CCR7⁺.
11. Utilisation des cellules dendritiques irréversibles $\alpha\text{v}\beta 3^-$, $\alpha\text{v}\beta 5^+$, CCR5⁻ et CCR7⁺ pour la préparation d'un agent d'immunothérapie utile pour le traitement de toute maladie impliquant le système immunitaire.
- 10 12. Procédé de traitement immunothérapeutique, caractérisé en ce qu'il consiste :
- 1) à prélever à un patient à traiter des cellules mononuclées par cytophérèse après mobilisation par chimiothérapie et/ou avec un facteur de croissance cellulaire et éventuellement congélation/décongélation ;
- 15 2) à cultiver, pendant 4 à 6 jours, des cellules mononuclées issues de cytophérèse après mobilisation, dans un milieu exempt de sérum complémenté avec de l'albumine humaine en présence d'un facteur stimulant les colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF) et d'une interleukine (IL) bloquant la différenciation vers la voie macrophagique ;
- 20 3) à ajouter au milieu de culture du TNF- α et éventuellement un médiateur inflammatoire et à poursuivre la culture pendant environ 1 à 4 jours supplémentaires en les activant par des antigènes spécifiques ;
- 4) à récupérer les cellules dendritiques ainsi formées et activées.
- 5) à réinjecter lesdites cellules dendritiques audit patient.
- 25 13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que lesdites cellules dendritiques sont congelées/décongelées avant d'être réinjectées audit patient.

1/6

A. GM-CSF + IL-4**B. GM-CSF + IL-4 + TNF****FIG.1****C. GM-CSF + IL-4 + TNF + PGE2**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2/6

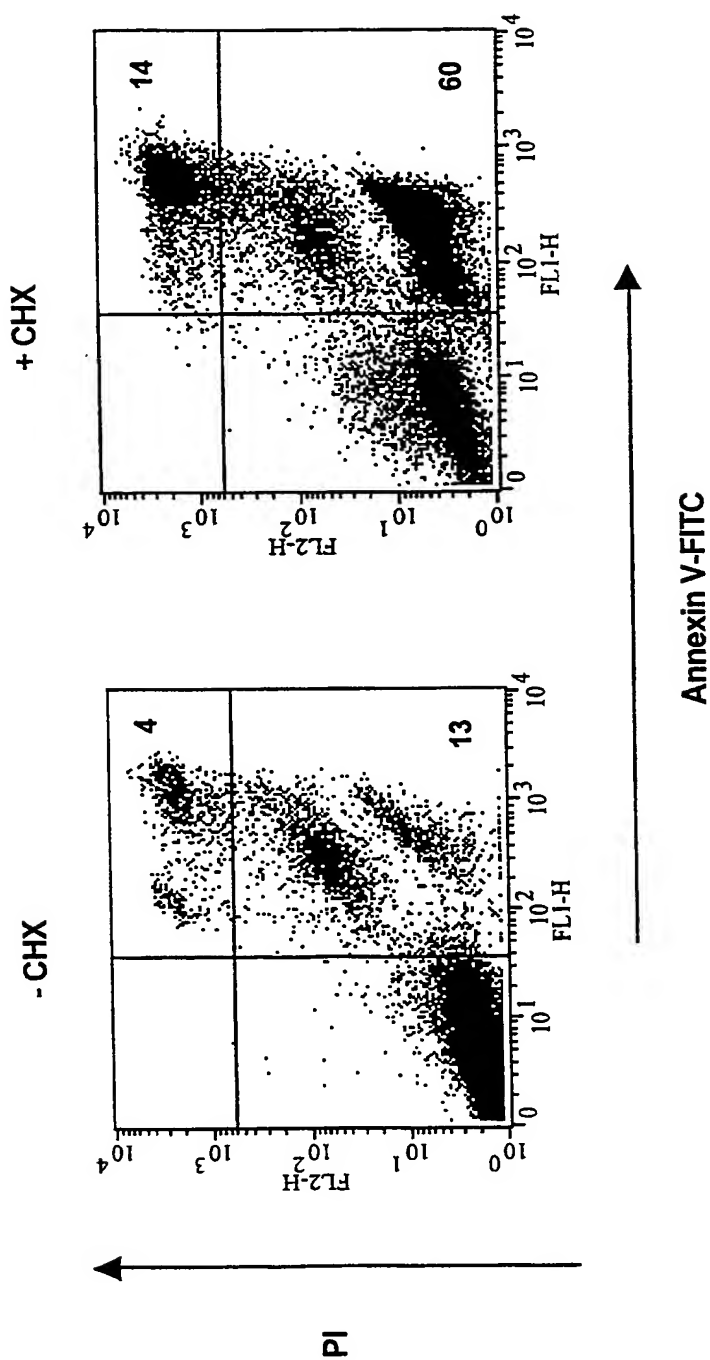
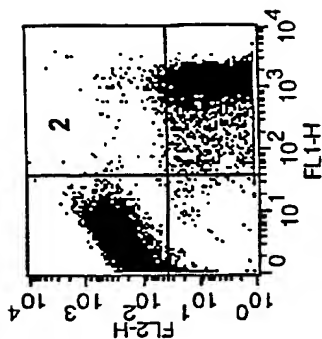


FIG.2

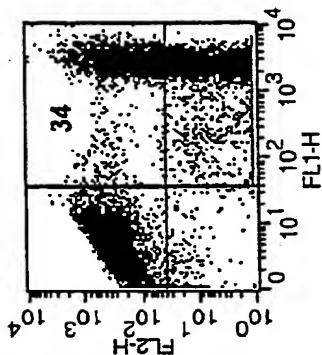
THIS PAGE BLANK (USPTO)

3/6

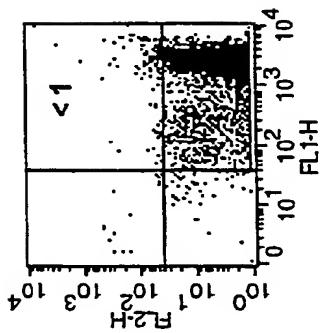
XG-1 + DC 4°C



XG-1 + DC 37°C

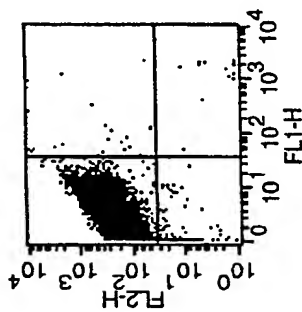


DC seules



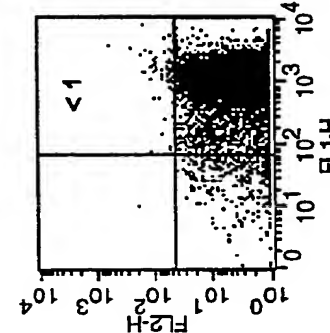
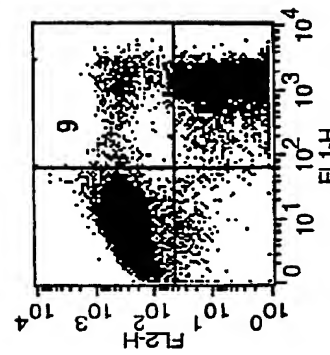
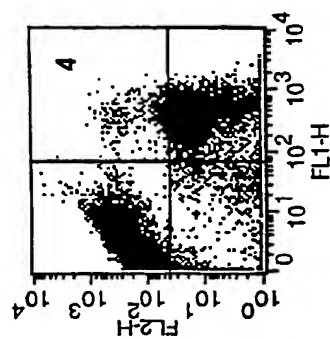
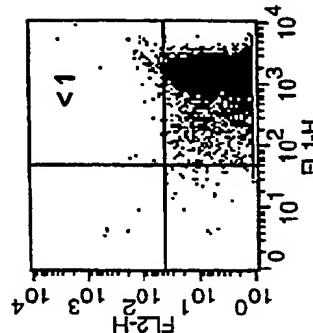
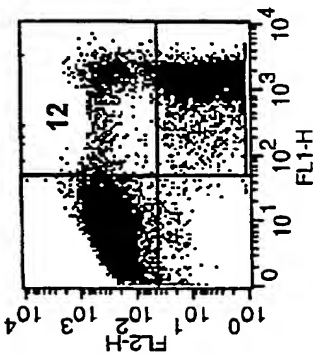
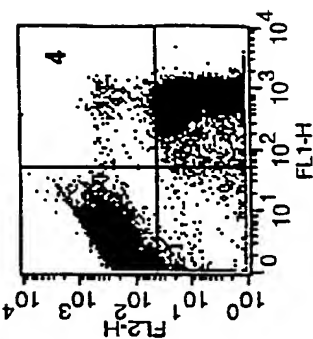
GM/
IL-4

XG-1 seules



GM/
IL-4/TNF

XG-1
Apoptotiques



GM/
IL-4/TNF/PGE2

DC

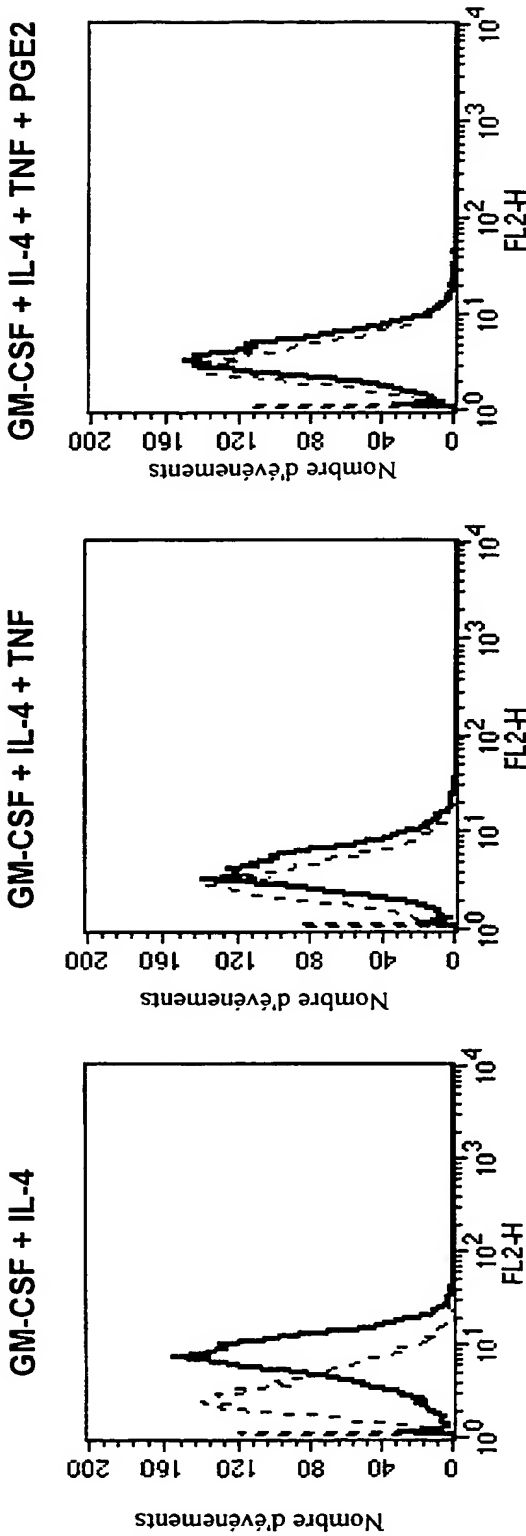
FIG.3

THIS PAGE BLANK (USPTO)

FIG.4

CCR5

A.



THIS PAGE BLANK (USPTO)

5/6

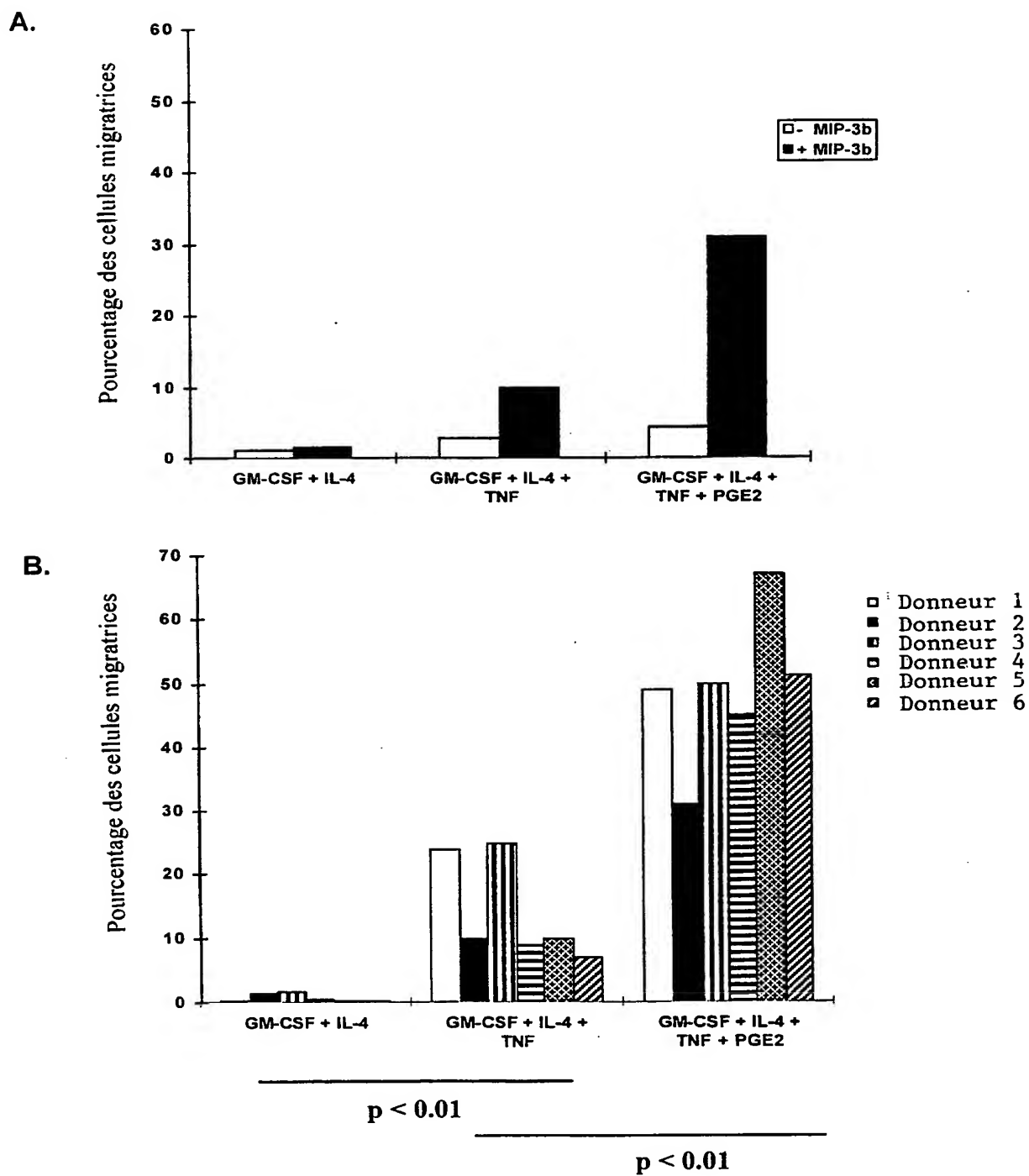


FIG.5

THIS PAGE BLANK (USPTO)

6/6

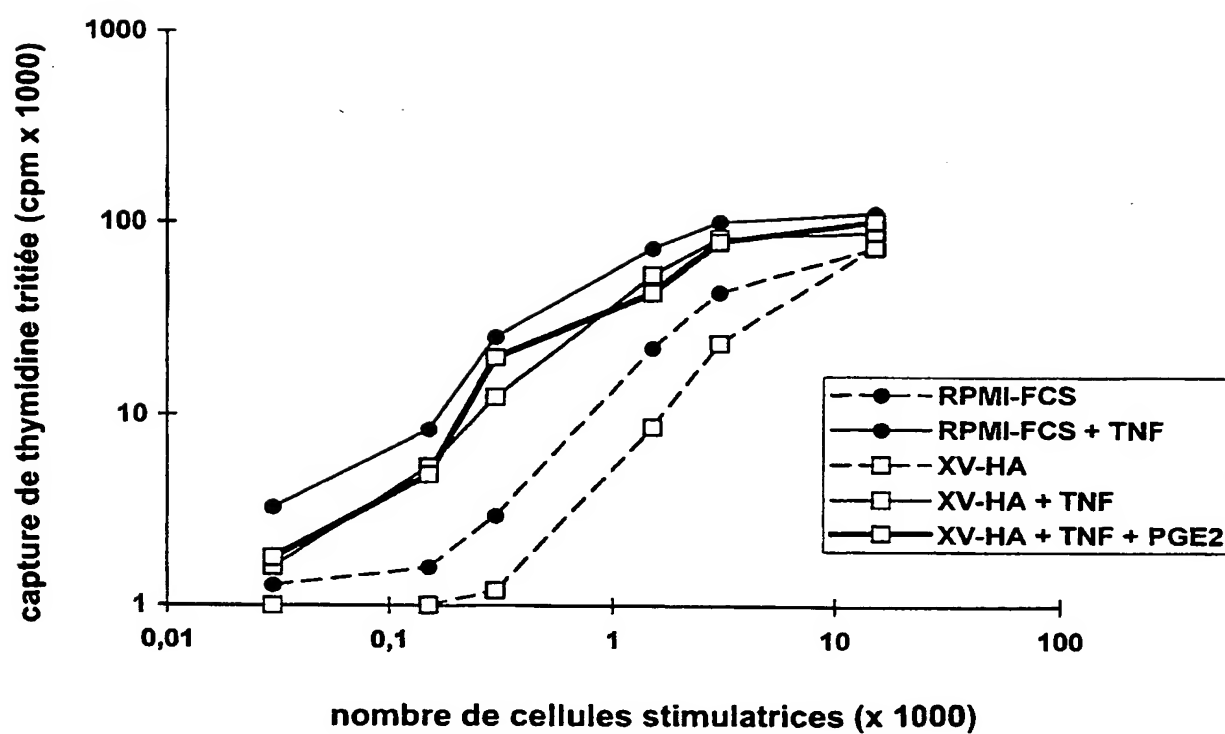


FIG.6

THIS PAGE BLANK (USPTO,

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/02173

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N5/06 C12N5/08 A61K35/14 A61P37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TARTE K ET AL: "Generation of virtually pure and potentially proliferating dendritic cells from non-cd34 apheresis cells from patients with multiple myeloma." BLOOD, (1997) 90 3482-95, XP000906762 page 3491, right-hand column, line 22 -page 3492, left-hand column, line 16 page 3494, left-hand column, line 31 - line 37	1-11
Y	---	12, 13
Y	WO 98 53048 A (THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA) 26 November 1998 (1998-11-26) claims 1-53 ---	12, 13
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 November 2000

Date of mailing of the international search report

28/11/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Le Flao, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/02173

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TARTE K ET AL: "Clinical-grade functional dendritic cells from patients with multiple myeloma are not infected with Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus." BLOOD, (15 MAR 1998) 91 1852-7, XP000906761 page 1852, right-hand column, line 1 - line 13 ---	1-11
A	FRESHNEY R.: "Culture of animal cells" 1987, ALAN R. LISS, INC., NEW YORK, US XP002136509 154920 page 73, left-hand column, line 6 - line 12 ---	8,9
A	ALBERT M ET AL: "Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphaVbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes." JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, (1998 OCT 15) 188 1359-68, XP000906793 abstract ---	10,11
A	SALLUSTO F ET AL: "Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation." EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1998) 28 2760-9, XP000906788 abstract ---	10,11
A	KALINSKI P ET AL: "Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+ CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1998) 161 (6) 2804-9, XP002136508 abstract -----	5

Information on patent family members

PCT/FR 00/02173

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den. le Internationale No

PCT/FR 00/02173

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12N5/06 C12N5/08 A61K35/14 A61P37/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N A61K A61P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	TARTE K ET AL: "Generation of virtually pure and potentially proliferating dendritic cells from non-cd34 apheresis cells from patients with multiple myeloma." BLOOD, (1997) 90 3482-95, XP000906762 page 3491, colonne de droite, ligne 22 -page 3492, colonne de gauche, ligne 16 page 3494, colonne de gauche, ligne 31 - ligne 37	1-11
Y	---	12,13
Y	WO 98 53048 A (THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA) 26 novembre 1998 (1998-11-26) revendications 1-53 ---	12,13
	--- -/--	



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

21 novembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

28/11/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Le Flao, K

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. .e Internationale No

PCT/FR 00/02173

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	TARTE K ET AL: "Clinical-grade functional dendritic cells from patients with multiple myeloma are not infected with Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus." BLOOD, (15 MAR 1998) 91 1852-7, XP000906761 page 1852, colonne de droite, ligne 1 - ligne 13	1-11
A	FRESHNEY R.: "Culture of animal cells" 1987, ALAN R. LISS, INC., NEW YORK, US XP002136509 154920 page 73, colonne de gauche, ligne 6 - ligne 12	8,9
A	ALBERT M ET AL: "Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphaVbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes." JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, (1998 OCT 15) 188 1359-68, XP000906793 abrégé	10,11
A	SALLUSTO F ET AL: "Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation." EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1998) 28 2760-9, XP000906788 abrégé	10,11
A	KALINSKI P ET AL: "Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+ CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1998) 161 (6) 2804-9, XP002136508 abrégé	5

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem. de Internationale No

PCT/FR 00/02173

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9853048 A	26-11-1998	AU 7499498 A EP 0983345 A	11-12-1998 08-03-2000

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 08 juin 2001 (08.06.01)	
Demande internationale no PCT/FR00/02173	Référence du dossier du déposant ou du mandataire 258820MLG1FD
Date du dépôt international (jour/mois/année) 28 juillet 2000 (28.07.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 29 juillet 1999 (29.07.99)
Déposant KLEIN, Bernard etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:



dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

27 février 2001 (27.02.01)



dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection



a été faite



n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI
 34, chemin des Colombettes
 1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

Antonia Muller

no de téléphone: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12N5/06 C12N5/08 A61K35/14 A61P37/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N A61K A61P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	TARTE K ET AL: "Generation of virtually pure and potentially proliferating dendritic cells from non-cd34 apheresis cells from patients with multiple myeloma." BLOOD, (1997) 90 3482-95, XP000906762 page 3491, colonne de droite, ligne 22 -page 3492, colonne de gauche, ligne 16 page 3494, colonne de gauche, ligne 31 - ligne 37	1-11
Y	---	12,13
Y	WO 98 53048 A (THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA) 26 novembre 1998 (1998-11-26) revendications 1-53 ---	12,13
	--- -/--	



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

E document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

L document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

O document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

P document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

21 novembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

28/11/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-2016

Fonctionnaire autorisé

Le Flao, K

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	TARTE K ET AL: "Clinical-grade functional dendritic cells from patients with multiple myeloma are not infected with Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus." BLOOD, (15 MAR 1998) 91 1852-7, XP000906761 page 1852, colonne de droite, ligne 1 - ligne 13 ---	1-11
A	FRESHNEY R.: "Culture of animal cells" 1987, ALAN R. LISS, INC., NEW YORK, US XP002136509 154920 page 73, colonne de gauche, ligne 6 - ligne 12 ---	8,9
A	ALBERT M ET AL: "Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphaVbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes." JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, (1998 OCT 15) 188 1359-68, XP000906793 abrégé ---	10,11
A	SALLUSTO F ET AL: "Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation." EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1998) 28 2760-9, XP000906788 abrégé ---	10,11
A	KALINSKI P ET AL: "Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+ CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1998) 161 (6) 2804-9, XP002136508 abrégé -----	5

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Cadre I Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☒ Les revendications n^{os} se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:

Bien que les revendications 12-13 concernent une méthode de traitement du corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit/à la composition.
2. ☐ Les revendications n^{os} se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n^{os} sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n^{os}
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n^{os}

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

PC1,FR 00/02173

Formulaire PCT/SA/210 (annexe familles de brevets) (juillet 1992)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire 258820MLG1FD	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après	
Demande internationale n° PCT/FR 00/ 02173	Date du dépôt international (jour/mois/année) 28/07/2000	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année)) 29/07/1999
Déposant CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 4 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.

☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

b. En ce qui concerne **les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :

☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.

☐ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☒ Il a été estimé que **certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche** (voir le cadre I).

3. ☐ Il y a **absence d'unité de l'invention** (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le **titre**,

☐ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.

☒ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

PROCEDE D'OBTENTION DE CELLULES DENTRITIQUES, LES CELLULES DENTRITIQUES AINSI OBTENUES ET LEURS UTILISATIONS A DES FINS CLINIQUES

5. En ce qui concerne l'**abrégi**,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure **des dessins** à publier avec l'abrégi est la Figure n°

☐ suggérée par le déposant.

☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.

☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☒ Aucune des figures n'est à publier.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C12N5/06 C12N5/08 A61K35/14 A61P37/00		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C12N A61K A61P		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	TARTE K ET AL: "Generation of virtually pure and potentially proliferating dendritic cells from non-cd34 apheresis cells from patients with multiple myeloma." BLOOD, (1997) 90 3482-95, XP000906762 page 3491, colonne de droite, ligne 22 -page 3492, colonne de gauche, ligne 16 page 3494, colonne de gauche, ligne 31 - ligne 37	1-11
Y	---	12,13
Y	WO 98 53048 A (THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA) 26 novembre 1998 (1998-11-26) revendications 1-53 --- -/--	12,13
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
21 novembre 2000		28/11/2000
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Le Flao, K

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	TARTE K ET AL: "Clinical-grade functional dendritic cells from patients with multiple myeloma are not infected with Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus." BLOOD, (15 MAR 1998) 91 1852-7, XP000906761 page 1852, colonne de droite, ligne 1 - ligne 13 ---	1-11
A	FRESHNEY R.: "Culture of animal cells" 1987, ALAN R. LISS, INC., NEW YORK, US XP002136509 154920 page 73, colonne de gauche, ligne 6 - ligne 12 ---	8,9
A	ALBERT M ET AL: "Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphaVbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes." JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, (1998 OCT 15) 188 1359-68, XP000906793 abrégé ---	10,11
A	SALLUSTO F ET AL: "Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation." EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1998) 28 2760-9, XP000906788 abrégé ---	10,11
A	KALINSKI P ET AL: "Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+ CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1998) 161 (6) 2804-9, XP002136508 abrégé -----	5

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/02173

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9853048 A	26-11-1998	AU 7499498 A EP 0983345 A	11-12-1998 08-03-2000

THIS PAGE BLANK (USPTO)



REC'D 26 SEP 2000	
WIPO	PCT

10/030151

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

FR 00/02173

4

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

28 JUL. 2000

Fait à Paris, le

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIÈGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

6 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

29 JUIL 1999

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

9909836

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

75 INPI PARIS

DATE DE DÉPÔT

29 JUIL 1999

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉECABINET BEAU DE LOMENIE
158, rue de l'Université
75340 PARIS CEDEX 07n° du pouvoir permanent H25882/1/MLG
références du correspondant 01.44.18.89.00
téléphone

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ Brevet d'invention☐ demande divisionnaire☐ certificat d'utilité☐ transformation d'une demande
de brevet européen

demande initiale

☐ brevet d'invention☐ certificat d'utilité n°

date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

"Procédé d'obtention de cellules dendritiques, les cellules dendritiques
ainsi obtenues et leurs utilisations à des fins cliniques".

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

Forme juridique

1. CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE de MONTPELLIER
2. CELLGEN SARL

- 1/ Etablissement Public
- 2/ Société à
Responsabilité
Limitée

Nationalité (s) 1 et 2 FRANCAISE

Adresse (s) complète (s)

- C.H.U. de MONTPELLIER
1. 371 Avenue du Doyen Gaston Giraud
34000 MONTPELLIER

Pays

FR

2. 314 rue du Mas du Juge
34980 St Gely du FESC

FR

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui☒ non

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐

requis pour la 1ère fois

☐

requis antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
(nom et qualité du signataire)

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

GILLARD MARIE-LOUISE CPTI N° 92-1999

BA 540 A/710200

Le 10/01/99 ou 01/01/99 relative à l'information aux fichiers et aux libertés s'applique aux données relatives à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08
Tél. : (1) 42 94 52 52 - Télécopie : (1) 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

9909836

TITRE DE L'INVENTION : "Procédé d'obtention de cellules dendritiques, les
cellules dendritiques ainsi obtenues et leurs
utilisations à des fins cliniques"

LE (S) SOUSSIGNÉ (S)

- 1/ CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE de MONTPELLIER - Etablissement public
- 2/ CELLGEN SARL - Société à Responsabilité Limitée

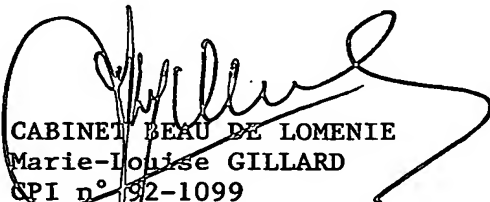
DÉSIGNE (NT) EN TANT QU'INVENTEUR (S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

- 1/ KLEIN Bernard
83, allée des Ecureuils
34980 St CLEMENT DE RIVIERE - FRANCE
- 2/ TARTE Karin
Terrasses de l'Oliveraie - B213
Rue E. Branly
34790 GRABELS - FRANCE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Paris, le 21 Octobre 1999


CABINET BEAU DE LOMENIE
Marie-Louise GILLARD
CPI n° 92-1099

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

[illegible]

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention « R.M. » (revendications modifiées).

La présente invention concerne le domaine de l'immunothérapie et plus particulièrement celui des cellules dendritiques et de leur utilisation à titre d'agent d'immunothérapie.

Les cellules dendritiques (DC) jouent un rôle clé dans l'initiation de la réponse immunitaire primaire et des études cliniques pilotes ont mis en évidence leur capacité à induire une immunité anti-tumorale efficace.

Les cellules dendritiques, qui sont présentes dans la peau (cellules de Langerhans), dans les muqueuses, le sang périphérique et la moelle osseuse, sont les cellules présentant des antigènes (Antigen-presenting cells ou APC) les plus puissantes dans le système immunitaire. Elles sont caractérisées par une morphologie unique et un phénotype de surface spécifique.

En particulier, elles expriment l'antigène CD83 et sont capables d'exprimer des quantités importantes de MHC classes I et II et d'initier des réactions mixtes avec les leucocytes (MLR). En revanche, elles sont dépourvues de certains marqueurs myéloïdes, notamment du marqueur CD14.

Etant donné leurs propriétés spécifiques, ces cellules ont été proposées comme éléments essentiels dans les thérapies cellulaires qui nécessitent la présentation d'antigènes aux lymphocytes T.

Les cellules dendritiques (DC) ont un mode de différenciation spécifique qui comprend deux stades importants, le stade immature et le stade mature, selon un ensemble de caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles (1,2). Les DC immatures obtenues *in vitro* à partir de monocytes par culture avec un facteur stimulant les colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF) et une interleukine bloquant la différenciation vers la voie macrophagique (IL-4 ou IL-13) sont analogues aux DC du tissu périphérique, c'est-à-dire aux cellules de Langerhans et aux cellules dendritiques interstitielles. Ces DC immatures sont capables de capturer les antigènes avec une grande efficacité en utilisant des récepteurs spécialisés, tels que les récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines (FcR) (3,4), le récepteur au mannose (MR) (5) et les récepteurs phagocytaires, en particulier CD36 et l'intégrine $\alpha\beta 5$ (6). Elles peuvent ainsi internaliser les protéines, les lysats de cellules entières, l'ARN et les cellules apoptotiques. En revanche, elles expriment seulement de faibles taux de molécules costimulatrices nécessaires pour l'activation des lymphocytes T.

Lorsqu'elles sont exposées à des signaux de maturation, donnés principalement par les antigènes, les cytokines inflammatoires ou les produits bactériens, les DC perdent leurs capacités phagocytaires et endocytaires (5,6) mais accroissent l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I, du CMH de classe II, l'expression de CD80 et CD86 et deviennent de très puissantes cellules présentant des antigènes (APC). Le passage du stade immature au stade mature est associé à l'expression des récepteurs des chémokines. Les DC matures ont une expression diminuée de CCR1 et CCR5, qui sont les récepteurs des chémokines inflammatoires, les protéines inflammatoires de macrophages MIP-1 α , MIP-1 β et RANTES, et de façon concomitante, elles ont une expression augmentée de CCR7, qui est le récepteur pour le ligand E1B (ELC)/MIP-3 β , lequel est exprimé de façon constitutive dans les organes lymphoïdes secondaires (7-9). Ces changements dans l'expression des récepteurs des chémokines sont importants pour la circulation *in vivo* des DC. Les DC immatures sont recrutées par les chémokines inflammatoires dans les sites d'entrée des antigènes. Après activation par les antigènes et stimuli inflammatoires, elles perdent les récepteurs CCR1 et CCR5 et acquièrent l'expression de CCR7. Les DC matures peuvent ensuite entrer dans les vaisseaux lymphatiques et migrer vers les ganglions lymphatiques afférents où elles présentent des épitopes dérivés d'antigènes pour les lymphocytes naïfs et les lymphocytes mémoires présents dans ces ganglions.

Ainsi, on a déjà proposé de les utiliser en tant que vecteurs pour des vaccinations anti-tumorales (10). Récemment, Nestle et al. ont montré que l'injection intralymphatique de DC immatures activées avec des peptides tumoraux ou des lysats cellulaires tumoraux ont pu provoquer une réponse immunitaire anti-mélanome (11).

L'utilisation de cellules dendritiques à des fins d'immunothérapie nécessite plusieurs millions de cellules à plusieurs reprises. De plus, ces cellules doivent être capables de circuler dans le corps humain de manière sélective vers les ganglions pour que le traitement soit efficace. Il importe également de disposer de cellules engagées de façon irréversible dans la voie de différenciation dendritique, c'est-à-dire de cellules matures qui ne soient pas susceptibles de se transformer dans l'organisme en macrophages.

Plusieurs études concernant la modulation des récepteurs des chémokines ont été réalisées avec des DC obtenues par culture dans un milieu contenant du sérum de veau fœtal (FCS). Or, les antigènes xénogènes peuvent être

immunodominants et peuvent gêner le développement de l'immunité anti-tumorale spécifique.

Différentes équipes de chercheurs se sont donc concentrées sur la production de DC dérivées de monocytes dans des milieux exempts de FCS en utilisant des milieux complémentés avec 1 à 10 % de plasma autologue (12-17), de sérum autologue (18) ou d'un pool de sérums humains AB (13,19-22,31). Toutefois, même le sérum autologue peut poser un problème puisqu'il contient de nombreuses protéines, en particulier des anticorps (23) qui peuvent modifier la voie de fixation et de modification intracellulaire des antigènes. De plus, certains antigènes tumoraux de type MUC-1 dans plusieurs cancers ou l'immunoglobuline monoclonale dans le myélome multiple, sont présents dans le sérum à des taux élevés et variables, ce qui peut affecter une présentation reproductible par les DC.

Pour toutes ces raisons, des procédés d'obtention de DC capables d'activer les lymphocytes T dans des milieux exempts de sérum ont été proposés (24-26).

Les demandes internationales WO98/23728, WO98/06823 et WO98/06826 décrivent également des procédés d'obtention des cellules dendritiques dans des milieux exempts de sérum. La demande internationale WO98/06826 décrit entre autre l'utilisation d'un milieu exempt de sérum, le milieu X-VIVO 15 complémenté avec 1% d'albumine humaine (HA). Il est précisé dans cette demande que l'utilisation de 1% de HA n'améliore pas de façon significative la croissance des cellules, leur phénotype ou leur capacité stimulante. De plus, l'expression de CD86 est augmentée au bout de 14 jours de culture dans un tel milieu.

On a maintenant trouvé, de façon surprenante, que l'on peut obtenir des quantités importantes de cellules dendritiques, qui peuvent être utilisées en immunothérapie par culture de cellules mononuclées particulières dans un milieu exempt de sérum convenablement complémenté avec de l'albumine humaine en présence d'un facteur stimulant la formation de colonies de granulocytes macrophages (GM-CSF) et d'une cytokine, en particulier l'interleukine-4 (IL-4) ou l'interleukine-13 (IL-13) puis en présence d'au moins un médiateur inflammatoire, tel que par exemple le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α).

Ainsi le procédé de l'invention consiste :

1) à cultiver pendant 4 à 6 jours, de préférence 5 jours des cellules mononuclées issues de cytophérèse après mobilisation dans un milieu exempt

de sérum complémenté avec de l'albumine humaine en présence d'un facteur stimulant les colonies de granulocyte-macrophage (GM-CSF) et d'une interleukine (IL) bloquant la différenciation vers la voie macrophagique ;

2) à ajouter au milieu de culture du TNF- α et éventuellement un médiateur inflammatoire et à poursuivre la culture pendant environ 1 à 4 jours, de préférence 2 jours supplémentaires ;

3) à récupérer les cellules dendritiques ainsi formées.

Avantageusement, on peut ajouter au milieu de culture, les deuxième et quatrième jours, du milieu frais contenant du GM-CSF et une interleukine.

10 Selon une variante de mise en œuvre du procédé de l'invention, on peut utiliser de la prostaglandine E2 (PGE2) conjointement avec le TNF- α .

Par "milieu de culture sans sérum" on désigne tout milieu de culture couramment utilisé pour la culture des cellules à des fins cliniques, qui contient les substances nutritives essentielles pour la croissance des cellules
15 hématopoïétiques notamment une source de carbone, d'azote, de la transferrine.

Ces milieux sont exempts de sérum humain ou de sérum animal.

Des exemples de milieux de culture exempts de sérum appropriés aux fins de l'invention sont décrits par exemple dans WO95/00632 et US5 405 772.

Des exemples particuliers de tels milieux sont les milieux X-VIVO 10 ou
20 X-VIVO 15 commercialisés par la société Biowhittaker, Walkersville, MD, USA.

Le milieu X-VIVO 15 est particulièrement préféré pour la mise en œuvre de l'invention.

Le milieu de culture doit être complémenté avec de l'albumine humaine à raison de 1 à 2 % (poids/volume), de préférence 2 %.

25 Par "cellules mononuclées" on désigne les cellules mononuclées (MNC) provenant du sang périphérique de sujets normaux ou de patients présentant un cancer ou toute autre maladie dans laquelle le système immunitaire est impliqué, telle que les maladies infectieuses, virales ou parasitaires, par exemple le Sida ou les maladies dysimmunitaires, telles que par exemple la polyarthrite
30 rhumatoïde, le lupus, etc.

Les cellules mononuclées (MNC) utilisées comme produit de départ dans le procédé selon l'invention sont des cellules mononuclées obtenues par cytophérèse après mobilisation par chimiothérapie et/ou par au moins un facteur de croissance cellulaire.

35 Ainsi, les cellules mononuclées utilisées dans le procédé de l'invention proviennent soit de sujets normaux ou de patients présentant un cancer qui ont

été soumis à une chimiothérapie, à savoir à un traitement spécifique à l'aide d'un agent chimiothérapeutique et éventuellement d'un facteur de croissance cellulaire, soit de patients présentant une maladie infectieuse, virale ou parasitaire qui ont été traités avec un facteur de croissance cellulaire, tel que les cytokines, y compris les facteurs de croissance hématopoïétiques.

A titre d'exemple de facteur de croissance qui peuvent être utilisés pour la mobilisation des cellules mononuclées, on peut citer :

- les facteurs stimulants les colonies de granulocytes (G-CSF), tels que les produits connus sous les dénominations commerciales « filgrastim NEUPOGEN » de Amgen-Roche, « Lenograstim GRANOCYTE » de Rhône-Poulenc/Chugai ;

- les facteurs stimulant les colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF), tel que les produits connus sous les dénominations commerciales LEUCOMAX de Schering Plough ou le facteur de croissance des cellules souches (SCF) de Amgen.

Les cellules mononuclées mobilisées qui sont mises en œuvre selon l'invention comprennent notamment les monocytes, les lymphocytes, les cellules souches hématopoïétiques.

La mobilisation par chimiothérapie est réalisée à l'aide de l'agent chimiothérapeutique approprié au type de cancer présenté par le patient, donneur des cellules à utiliser dans le procédé de l'invention. On peut utiliser un agent chimiothérapeutique quelconque, tel que par exemple le cyclophosphamide.

Les quantités de GM-CSF, d'interleukine, de TNF- α et de PGE2 à utiliser dans le procédé de l'invention sont celles qui sont habituellement utilisées pour les cultures cellulaires.

On précisera que le GM-CSF peut être utilisé à raison de 1 ng/ml à 1 000 ng/ml, de préférence 50 à 500 ng/ml, avantageusement 100 ng/ml de milieu.

L'interleukine IL-4 est généralement utilisée en des quantités allant de 1 ng/ml à 1 000 ng/ml, de préférence 10 à 50 ng/ml, avantageusement 25 ng/ml de milieu.

On peut également utiliser le TNF- α à raison de 1 ng/ml à 1 000 ng/ml et la PGE2 à raison de 10 ng/ml à 10 μ g/ml, avantageusement de 20 ng/ml à 1 μ g/ml.

La culture des cellules précurseurs de cellules dendritiques est réalisée dans des récipients en plastique couramment utilisés dans ce domaine, tels que les flacons ou sacs de cultures cellulaires permettant l'adhérence des cellules.

5 La culture est avantageusement réalisée dans des incubateurs dans les conditions normales de culture de cellules (stérilité ; CO₂ environ 5 % ; humidité environ 95 % et température environ 37°C).

Selon un autre aspect, l'invention a pour objet des cellules dendritiques qui sont $\alpha\beta_3^-$; $\alpha\beta_5^+$; CCR5⁻ et CCR7⁺, c'est-à-dire qu'elles sont dépourvues des
10 récepteurs $\alpha\beta_3^-$ et CCR5 et pourvues des récepteurs $\alpha\beta_5$ et CCR7.

Ces cellules dendritiques, qui peuvent être obtenues par le procédé défini précédemment, sont des cellules matures irréversibles. Elles sont utilisables comme agent d'immunothérapie dans toutes les thérapies cellulaires, telles que par exemple le traitement des cancers ou des maladies infectieuses, virales ou
15 parasitaires.

Ainsi l'invention a également pour objet l'utilisation des cellules dendritiques $\alpha\beta_3^-$; $\alpha\beta_5^+$; CCR5⁻ et CCR7⁺ pour la fabrication d'un agent d'immunothérapie utile pour le traitement de toute maladie impliquant le système immunitaire.

20 En effet, avec les cellules dendritiques selon l'invention on peut réduire l'internalisation et la présentation de protéines xénogènes, allogènes ou autologues non identifiées et limiter ainsi les réponses immunitaires qui ne sont pas spécifiques aux antigènes tumoraux.

Les DC selon l'invention sont capables de capturer *in vivo* des antigènes
25 tumoraux soit par endocytose des protéines soit par phagocytose des cellules apoptotiques.

Ces DC sont capables de migrer vers les ganglions lymphatiques afin de présenter les peptides dérivés d'antigènes dirigés contre les lymphocytes T. Elles sont également capables de produire l'interleukine-12 favorisant une
30 différenciation des cellules CD8⁺ naïves en des lymphocytes T cytotoxiques. Elles présentent un phénotype stable après retrait des cytokines utilisées lors des cultures *ex vivo*.

Le procédé de l'invention permet d'obtenir des cellules dendritiques immatures et des cellules dendritiques matures.

35 En présence de GM-CSF et d'une interleukine, on obtient des cellules dendritiques immatures CD83⁻ CD14^{faible}. Ces DC expriment HLA-DR, CD80 et

CD86 ainsi que des récepteurs endocytaires et phagocytaires, à savoir MR, CD36 et $\alpha\text{v}\beta 5$.

De plus, ces DC immatures sont capables de phagocyter des cellules tumorales apoptotiques par la phagocytose des monocytes apoptotiques. Une stimulation de ces DC immatures avec du TNF- α plus GM-CSF et IL-4 pendant 2 jours supplémentaires conduit à l'obtention de cellules correspondant de façon phénotypique et fonctionnelle à des cellules dendritiques matures. Ces cellules matures ont exprimé CD83 et des quantités plus élevées de HLA-DR, CD80 et CD86 par rapport aux DC immatures GM/IL-4.

Elles sont capables d'activer les lymphocytes T allogènes avec la même efficacité que les DC matures obtenues en présence de FCS.

De plus, ces DC matures expriment également des récepteurs endocytaires comme les récepteurs au mannose ou les récepteurs à la phagocytose de type $\alpha\text{v}\beta 5$ et CD36. Ces DC matures ont toutefois une capacité pour endocyter le dextrane ou phagocyter les cellules tumorales apoptotiques plus faibles que les DC immatures dont elles sont issues.

La réponse aux chémokines pour les DC obtenues selon l'invention, a été modulée de façon similaire à celle des DC obtenues dans du milieu contenant du FCS. En fait, les DC immatures obtenues selon l'invention ont exprimé CCR5 et n'ont pas répondu à MIP-3 β . Ainsi, après injection in vivo, ces cellules devraient être piégées de préférence dans des sites inflammatoires où MIP-1 α , MIP-1 β ou RANTES sont produits (25). Après traitement avec du TNF- α , les DC selon l'invention ont perdu l'expression de CCR5 et ont acquis la capacité de répondre à MIP-3 β . On peut penser qu'une proportion élevée de ces DC matures sera capable d'être piégée dans des zones de ganglions lymphatiques de cellules T où le MIP-3 β est produit et d'initier une réponse immunitaire efficace.

De plus, on a montré que la PGE2 qui est connue pour accroître la maturation des DC dans des milieux sans FCS (14,21), peut jouer un rôle sur la migration des DC. Dans les conditions de culture selon l'invention, la PGE2 n'a pas largement modifié le phénotype des DC produites avec GM/IL-4 et TNF, à l'exception d'un accroissement de l'expression de CD83, et n'a pas d'effet additif supplémentaire avec TNF- α pour l'activation des cellules T. Toutefois, la PGE2 a accru la migration des DC en réponse à MIP-3 β . La migration des DC dans les organes lymphoïdes peut donc être sélective.

Afin d'induire la production des cellules T cytotoxiques anti-tumorales, les DC doivent être capables de diriger la différenciation des cellules T naïves vis-à-

vis du sous-ensemble de type 1 exprimant IFN- γ et IL-2. L'IL-12 constitue la cytokine principale impliquée dans la polarisation de cellules TCD4+ vis-à-vis des cellules Th1. Dans le modèle de réponse des cellules T anti-EBV, il a été mis en évidence que l'expression de IL-10 par des lignées cellulaires lymphoblastoïdes est associée avec l'émergence des cellules T CD8+ de type 2 (32) qui produisent IL-4 et IL-10 et qui ne sont pas cytotoxiques (33). Au contraire, les cellules CD8+ de type 1 produisent de l'IFN- γ et de l'IL-2 et sont cytotoxiques. Ainsi, des DC produites *in vitro* à des fins de vaccination anti-tumorale doivent idéalement produire IL-12 et non IL-10. En effet, IL-10 possède un effet nocif supplémentaire sur la maturation des DC. En fait, les DC traitées avec IL-10 pendant la phase de maturation induisent l'anergie spécifique aux antigènes des cellules T CD4+ et CD8+ (25,34). Les DC obtenues selon l'invention, différentes de celles obtenues en présence de FCS (35,36), ont produit uniquement de faibles quantités de IL-12 mais des quantités importantes de IL-10 en réponse à la ligature à CD40, en accord avec les études montrant que les DC myéloïdes étaient capables de produire IL-10, en particulier en suivant la stimulation par CD40 (37,38).

Toutefois, on a montré que la maturation des DC induites par TNF- α a entraîné l'induction de la production de IL-12 et une inhibition dramatique de la synthèse de IL-10 après activation par CD40. Ainsi, les DC matures selon l'invention sont capables de déclencher la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T de type 1. L'addition de PGE2 a de plus inhibé la production de IL-10 mais également la production de IL-12 matures obtenues.

L'invention a également pour objet un procédé de traitement immunothérapeutique qui consiste à prélever à un patient à traiter des cellules mononuclées par cytophérèse après mobilisation par chimiothérapie et/ou un facteur de croissance cellulaire et éventuellement congélation/décongélation, à traiter lesdites cellules selon le procédé défini ci-dessus et ensuite à réinjecter les cellules DC obtenues audit patient.

Les DC selon l'invention conviennent en particulier pour les traitements par allogreffes ou autogreffes.

L'invention va être illustrée plus en détail par les exemples ci-après donnés à titre non limitatifs et par les figures qui représentent ci-après :

- la Figure 1 montre l'effet de la maturation des DC sur l'endocytose de FITC-dextran :

A) avec des DC obtenues par culture sur milieu X-VIVO 15-2 % HA en présence de GM-CSF et IL-4 ;

B) avec des DC obtenues par culture sur milieu X-VIVO 15-2 % HA en présence de GM-CSF, IL-4 et TNF- α ;

5 C) avec des DC obtenues par culture sur milieu X-VIVO 15-2 % HA en présence de GM-CSF, IL-4 et PGE 2.

Les courbes en pointillés correspondent au temps d'incubation des DC avec FITC-dextran de 7 minutes, les courbes en traits pleins à l'incubation pendant 15 minutes et les courbes en traits gras à l'incubation pendant 30 minutes ; sur l'axe des abscisses sont indiquées l'intensité de fluorescence et sur l'axe des ordonnées le nombre d'évènements ;

- la Figure 2 montre l'apoptose de cellules XG-1 par le cycloheximide (CHX) par mesure de la fluorescence des cellules colorées par l'Annexin-V FITC et par l'iodure de propidium (PI) ;

- la Figure 3 montre la phagocytose des cellules tumorales apoptotiques par les DC immatures et l'absence de phagocytose par les DC matures ;

20 - la Figure 4 montre l'effet de la maturation des DC sur l'expression de CCR5.

- la Figure 5 montre la migration des DC matures et la non-migration des cellules immatures en réponse à (ELC)/MIP-3 β .

25 - la Figure 6 montre l'activation des cellules T allogènes par les DC matures.

EXEMPLE 1 : Production des cellules dendritiques (DC)

30 On a recueilli des cellules de cytophérèse (AC) provenant de quatre patients présentant différents cancers pendant la mobilisation des précurseurs hématopoïétiques avec le cyclophosphamide et le facteur humain de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF, filgrastim ; NEUPOGEN, Amgen-Roche, Neuilly-sur-Seine, France). Chaque lot de cellules AC recueillies a été congelé

35 dans de l'azote liquide puis décongelé et lavé à deux reprises en présence d'un chélateur du calcium et du magnésium. Chaque lot de cellules a ensuite été mis

dans un flacon de culture cellulaire contenant du milieu X-VIVO 15 complémenté avec 2 % d'albumine humaine (X-VIVO-2% HA) et on a laissé les cellules adhérer sur la surface du flacon de culture pendant 2 h. On a éliminé les cellules qui n'ont pas adhéré et on a cultivé les cellules qui ont adhéré en présence de

5 100 ng/ml de GM-CSF (Leucomax, Sandoz, Basel, Suisse) et 25 ng/ml de IL-4 (R&D Systems, Minneapolis, MN) pendant 7 jours dans du milieu X-VIVO 15 complémenté avec 2 % de HA. A des fins de comparaison, on a également cultivé des cellules qui ont adhéré en présence de 100 ng/ml de GM-CSF et 25

10 ng/ml de IL-4 soit dans du milieu RPMI 1640 complémenté avec 10 % de FCS (milieu de référence), soit dans du milieu X-VIVO 15 seul ou dans du milieu X-VIVO 15 complémenté avec 5 % de SAB, 5 % de sérum autologue ou 5 % de plasma autologue. Dans chaque cas, on a ajouté les deuxième et quatrième

15 jours du milieu frais contenant GM-CSF et IL-4. Après 5 jours de culture, on a ajouté du milieu contenant GM-CSF et IL-4 avec du TNF- α (R&D Systems) à 20 ng/ml ou du TNF- α à 20 ng/ml et du PGE2 (Sigma Chemical, St Louis, MO) à 1 μ g/ml. Après 48 h, on a recueilli les cellules et on les a comptées. Le

20 rendement en cellules est donné dans le tableau I où on constate que le rendement en cellules obtenu en présence de GM-CSF et de IL-4 a atteint 12 % avec du sérum AB, 18 % avec du plasma autologue, 22 % avec du sérum autologue et 16 % avec du HA. Le milieu X-VIVO 15-2 % de HA complémenté avec GM-CSF et IL-4 est le milieu le plus efficace pour obtenir des DC

immatures de qualité clinique CD14^{-faible} CD83⁻ HLA-DR⁺⁺ exprimant de grandes quantités de CD80 et CD86.

Comme le montrent également les résultats du tableau I, le sérum AB, le

25 plasma autologue et le sérum autologue ont été moins actifs que HA pour l'obtention *in vitro* des DC matures.

Etant donné qu'une cytophérèse de 5 heures permet en général de récupérer 40 à 50 x 10⁹ cellules mononuclées, on a donc pu obtenir dans les conditions opératoires de l'invention 6 à 8 x 10⁹ DC de façon reproductible.

30 Cette quantité de cellules est suffisante pour permettre au moins 6 vaccinations avec 10⁹ DC.

La culture de cellules sur milieu X-VIVO 15 seul a été réalisée à partir des cellules de cytophérèse de 8 donneurs mobilisées par le facteur de croissance hématopoïétique (G-CSF) ou par le cyclophosphamide et le facteur de

35 croissance hématopoïétique.

Pour 5 des 8 donneurs, les cellules cultivées en milieu X-VIVO 15 en présence de GM-CSF et d'IL-4 pendant 7 jours avaient une viabilité inférieure à 65% ce qui n'a pas permis d'analyser leur phénotype et leurs fonctions contrairement aux cellules des mêmes donneurs cultivées en présence de X-VIVO 15-2% d'albumine humaine, GM-CSF et IL-4 pendant 7 jours.

Le milieu X-VIVO 15 seul ne permet pas de générer de façon reproductible des cellules dendritiques immatures. L'addition de 2% d'albumine humaine a permis dans tous les cas une génération de cellules dendritiques parfaitement viables et fonctionnelles et irréversibles.

EXEMPLE 2 : Analyse phénotypique par cytométrie de flux des cellules DC

Pour caractériser le phénotype des DC obtenues selon l'exemple 1, on a déterminé le pourcentage de cellules exprimant CD14, HLADR, CD83, CD80 et CD86 par cytométrie de flux (FACS) en utilisant les anticorps monoclonaux suivants : CD1a-PE, CD14-PE, CD36-FITC, CD80-PE, CD83-PE, HLA-DR-FITC (Immunotech, Marseille, France); les anticorps monoclonaux CCR5-PE, CD51/CD61-FITC, CD86-FITC, MR-PE (Pharmingen, San Diego, CA) et les anticorps murins IgG appariés suivant l'isotype (Immunotech).

Le phénotype total des DC obtenus selon l'exemple 1 est similaire à celui des DC immatures obtenues par culture dans le milieu RPMI en présence de FCS (tableau I). En utilisant le milieu X-VIVO 15 complété avec du sérum AB, du plasma autologue ou du sérum autologue, le pourcentage des cellules CD14⁺ a été grandement augmenté (jusqu'à 80 % dans du X-VIVO 15-sérum AB) et les cellules résultantes ont exprimé une densité plus faible de HLA classe II et de molécules costimulatrices. En revanche, selon le procédé de l'invention, c'est-à-dire avec le milieu X-VIVO 15-2 % de HA, on a pu obtenir un nombre élevé de DC (CD14⁺, HLA-DR⁺⁺, CD80⁺⁺, CD86⁺⁺) sans addition de protéines xénogènes, de protéines allogènes, d'anticorps humains ou d'antigènes tumoraux autologues non identifiés.

Des résultats similaires ont été obtenus avec des AC provenant de quinze donneurs, cultivées dans les conditions opératoires de l'invention, c'est-à-dire dans un milieu X-VIVO 15 complété avec 2 % d'albumine humaine en présence de GM-CSF, IL-4 et TNF- α avec ou sans PGE2. Ces résultats figurent dans le tableau II.

Le CD83, marqueur spécifique des DC matures, a pu être détecté après 24 h de culture en présence de TNF- α et a atteint un maximum

d'expression en 48 h. La combinaison de PGE2 et TNF- α a induit l'expression de CD83 jusqu'à 83 % de cellules par rapport à 64 % avec du TNF- α seul ($p = 0,007$) (tableau II). Les PGE2 ont également coopéré avec le TNF- α pour la régulation en amont de CD80 et CD86 sur les DC (tableau I et tableau II).

5 Dans une autre série d'expériences, on a opéré dans les mêmes conditions que ci-dessus sauf que le cinquième jour, on a ajouté la PGE2 sans TNF- α .

Le pourcentage des cellules CD14⁺ obtenues en présence de GM-CSF + IL-4 + PGE2 était supérieur à celui obtenu en présence de GM-CSF et IL-4 seuls, ce qui suggère que le PGE2, lorsqu'il est utilisé sans TNF- α induit
10 la réversion d'au moins certaines DC immatures en cellules de type macrophage bien que le GM-CSF et IL-4 étaient continuellement présents dans le milieu de la culture.

De la même façon, quand les DC immatures, obtenues dans du X-VIVO 15-2 % de HA complémenté avec GM-CSF et IL-4, ont été récoltées le
15 septième jour, lavées de façon extensive et cultivées dans le milieu de culture sans cytokine pendant 3 jours supplémentaires, elles ont de nouveau adhéré au sac de culture et ont exprimé CD14. Il s'agit là d'une réversion de ces DC immatures en cellules de type macrophage. En revanche, la morphologie cellulaire et le phénotype cellulaire des DC matures, produites par addition de
20 TNF- α seul ou de TNF- α + PGE2, n'ont pas été affectés de façon marquée après retrait des cytokines, ce qui indique que la maturation a eu lieu de manière irréversible.

EXEMPLE 3 : Endocytose par MR

25 On a étudié l'endocytose au niveau cellulaire des DC obtenues par culture de cellules AC mobilisées selon le traitement indiqué dans l'exemple 1 dans du milieu X-VIVO 15 - 2 % HA en présence de GM-CSF et d'IL-4 pendant cinq jours. Le cinquième jour, on a ajouté du milieu frais contenant GM-CSF et IL-4, ou GM-CSF, IL-4 et TNF- α ou GM-CSF et IL-4, TNF- α et PGE2. Le septième
30 jour, on a déterminé l'expression de MR, CD36, $\alpha\beta 3$ et $\alpha\beta 5$ par la méthode d'analyse FACS.

Pour déterminer l'expression du marqueur MR on a opéré selon la méthode décrite par Tarte et al. (27) en utilisant du FITC-dextran pouvant fixer la lysine, MM = 40 000 (Molecular Probes Inc., Eugene, OR). On a recueilli les DC
35 immatures et matures le septième jour et on les incubées à 37°C pendant 7, 15 et 30 min ou à 4°C pendant 30 min (fixation de fond) avec 1 mg/ml de FITC-

dextran. On a ensuite lavé les DC avec du PBS froid complétement avec 1 % de FCS et 0,02 de NaN_3 et on a analysé la fluorescence avec un appareil FACScan.

La moyenne du pourcentage de cellules positives obtenues par culture des AC de six donneurs est indiquée dans le tableau III.

5 Ces résultats montrent que les DC immatures obtenues dans du X-VIVO 15-2 % de HA par culture de 7 jours avec GM-CSF et IL-4 ont largement exprimé des MR et cette expression a significativement diminué de plus de 50 % lors de la maturation des DC induite soit par $\text{TNF-}\alpha$ seul ($p = 0,03$), soit par $\text{TNF-}\alpha + \text{PGE}_2$ ($p = 0,03$).

10 L'endocytose du FITC-dextran par les cellules matures obtenues selon l'invention avec du $\text{TNF-}\alpha$ ou du $\text{TNF-}\alpha + \text{PGE}_2$ a profondément diminué par rapport aux DC immatures comme cela est montré par la Figure 1.

EXEMPLE 4 : Induction de l'apoptose dans les cellules plasmatiques malignes

15 Pour tester le potentiel phagocytaire des DC obtenues selon le procédé de l'invention, on a utilisé des cellules tumorales apoptotiques.

XG-1 est une lignée cellulaire de myélome multiple dont les caractéristiques ont été décrites en détail par Zhang et al. (28). On a incubé des cellules XG-1 ($2,5 \times 10^5/\text{ml}$) avec $4 \mu\text{m}/\text{ml}$ de cycloheximide (CHX) dans du milieu RPMI 1640-10 % de FCS complétement avec 3 ng/ml de IL-6 à 37°C . On a enregistré la cinétique de l'apoptose cellulaire en utilisant une double coloration avec le colorant connu sous la dénomination Annexin-V FITC (Boehringer Mannheim, Meylan, France) et de l'iodure de propidium (PI) (Sigma). Dans un premier temps, les cellules apoptotiques ont été colorées uniquement par l'Annexin-V

25 (Annexin-V⁺/PI⁻) tandis que dans un deuxième temps, les cellules nécrotiques ont incorporé également du PI en raison d'une perte de l'intégrité de leur membrane (Annexin-V⁺/PI⁺). Après traitement avec le CHX, on a lavé les cellules tumorales à trois reprises dans du X-VIVO 15-2 % de HA avant de les mettre en coculture avec des DC obtenues selon le mode opératoire décrit à l'exemple 1.

30 Les résultats obtenus sont reportés sur la figure 2. Ces résultats montrent qu'après 6 h de culture avec $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ de CHX, 60 % des cellules de myélome XG-1 ont montré des caractéristiques de mort cellulaire apoptotique précoce, c'est-à-dire une liaison de Annexin-V mais une non-incorporation de PI.

EXEMPLE 5 : Phagocytose des cellules apoptotiques

La phagocytose des cellules apoptotiques constitue un autre mode d'entrée des antigènes et joue un rôle majeur dans le phénomène d'amorçage croisé. Récemment, plusieurs récepteurs phagocytaires ont été identifiés sur les DC
 5 obtenues en présence des sérums humains et il a été montré qu'un milieu conditionné pour des monocytes (MCM), qui conduit à une maturation des DC irréversible, régule en aval leur expression (6).

On a teinté en vert les DC immatures et matures en utilisant du PKH67-GL (Sigma) et on les a cultivées pendant 2 h pour permettre la libération du colorant
 10 non lié. On a teinté en rouge des cellules XG-1 en utilisant du PKH26-GL (Sigma) selon les instructions du fabricant avant leur induction pour subir l'apoptose par CHX pendant 6 à 8 h. Ensuite, on a cocultivé les cellules XG-1 teintées en rouge avec des DC immatures ou matures teintées en vert dans un rapport de 1:1 dans du X-VIVO 15-2 % de HA selon le protocole décrit par Albert
 15 et al. (6). Après 90 min à 37°C, on a analysé les fluorescences vertes et rouges avec un appareil FACScan. Dans les expériences de blocage, on a co-incubé les cellules XG-1 et les DC à 4°C.

Les marqueurs CD36, $\alpha\beta 3$ et $\alpha\beta 5$ ont été déterminés selon la méthode par marquage par anticorps monoclonaux et cytométrie de flux.

20 Pour la coloration de $\alpha\beta 5$, on a tout d'abord incubé les cellules avec un anticorps mAb primaire $\alpha\beta 5$ (Chemicon Int, Temecula, CA), puis avec un anticorps de chèvre anti-Ig de souris conjugué à FITC (Immunotech). On a réalisé les analyses avec un appareil FACScan (Becton Dickinson).

Les données provenant d'une expérience représentative parmi 3 sont
 25 représentées sur la figure 3. Plus d'un tiers des DC immatures ont englouti des XG-1 apoptotiques après 90 min de coculture. Seuls 10 à 12 % des DC immatures ont été teintées deux fois après coculture avec des cellules XG-1 non-apoptotiques. La phagocytose des cellules tumorales par des DC immatures a été confirmée visuellement sur des cytoplines de cocultures teintées. La
 30 phagocytose a été complètement bloquée à basse température (figure 3). L'induction de la maturation des DC a produit une diminution de l'activité phagocytaire. En effet, seuls 12 % des DC matures obtenues après addition de TNF- α ont internalisé les XG-1 apoptotiques après 90 min de coculture (figure 3). Une même diminution de la phagocytose a été obtenue avec des DC matures
 35 obtenues avec TNF- α + PGE2 (figure 3).

Dans les conditions de l'invention, les DC immatures ont exprimé des quantités élevées de CD36 et d'intégrine $\alpha\beta 5$; en revanche l'intégrine $\alpha\beta 3$ n'a pas été détectée comme le montrent les résultats consignés dans le tableau III. Ces résultats montrent également qu'en présence de TNF- α , les expressions de CD36 et $\alpha\beta 5$ ont été significativement diminuées respectivement de plus d'un demi ($p = 0,002$) et de 20-35 % ($p = 0,03$). Le PGE2 n'a pas eu d'effet supplémentaire avec le TNF- α pour la diminution de l'expression des récepteurs phagocytaires.

10 **EXEMPLE 6 : Réponse aux chémokines des DC**

On a répété l'opération avec six donneurs différents et on a mesuré l'intensité moyenne de fluorescence (MFI). Les résultats obtenus figurent dans le tableau 4.

1) détection du récepteur CCR5

15 Dans ce test, on a utilisé l'anticorps monoclonal anti-CCR5 (PharMingen, San Diego, CA, USA) pour détecter le récepteur CCR5 qui est un récepteur pour les chémokines inflammatoires.

On a incubé les cellules DC matures ou immatures obtenues dans le milieu X-VIVO 15 - 2 % HA avec ledit anticorps marqué et on a mesuré l'expression de CCR5 pour un donneur. Les résultats sont rassemblés dans les figures 4a, 4b et 4c.

Dans cet exemple, on a recherché la présence du CCR5 sur les DC immatures et les DC matures produites dans du milieu X-VIVO 15 - 2 % HA.

25 Le CCR5, a été détectable sur les DC immatures produites dans du milieu X-VIVO 15-2 % HA mais son expression a été significativement réduite par une incubation de 48 h avec du TNF- α ($p = 0,03$). Le PGE2 n'a pas induit de diminution significative supplémentaire (figure 4) ($p = 0,25$).

2) détection du récepteur CCR7

30 Comme aucun anticorps monoclonal n'était disponible pour mesurer l'expression de CCR7, on a testé la réponse des DC à MIP-3 β dans un essai de chimiotactisme.

On a introduit les DC immatures et matures (2×10^5 cellules) dans 100 μ l de RPMI-1 % de HA dans la chambre supérieure d'un dispositif de séparation de cellules constitué de deux chambres de culture cellulaire (une chambre inférieure et une chambre supérieure séparées par un filtre ayant des pores de 5 μ m permettant le passage des cellules migratrices (dispositif Transwell de Costar,

Cambridge, MA). Dans la chambre inférieure, on a introduit 600 μ l de ELC/MIP-3 β dilués à 100 ng/ml dans le même milieu. Après une incubation de 4 h à 37°C, on a recueilli les cellules qui ont migré dans la chambre inférieure et on a comptées au microscope. On a exprimé les résultats par le pourcentage des cellules d'entrée qui ont migré dans la chambre inférieure (pourcentage des cellules migratrices). La migration des DC provenant d'un donneur en l'absence et en présence de MIP-3 β est représentée sur la figure 5A et les résultats obtenus avec les DC issues d'AC de 6 donneurs avec MIP-3 β sont consignés sur la figure 5B. Les DC immatures cultivées avec GM-CSF et IL-4 n'ont pas répondu à MIP-3 β (pourcentage moyen de cellules qui ont migré : 0,7 %, n=6). L'addition de TNF- α au cinquième jour a accru significativement la réponse des DC (p = 0,002) avec une moyenne de 14,2 % de cellules en migration (n = 6). Le PGE2 a agi de façon synergique avec TNF- α puisque 31 à 67 % (moyenne : 48,8 %, n = 6) des DC maturées avec TNF- α + PGE2 ont migré jusqu'à la chambre inférieure du dispositif transwell pendant une durée d'incubation de 4 h à 37°C (p = 0,002) par rapport aux DC maturées avec du TNF- α . Ceci a été associé à une légère augmentation de la migration spontanée des DC (une moyenne de 7 % des DC d'entrée a été trouvée dans la chambre inférieure en l'absence de MIP-3 β).

EXEMPLE 7 : Analyse des cytokines

On a récolté les DC immatures et matures obtenues après 7 jours de culture dans du X-VIVO 15-2 % de HA, on les a lavées et on les a étalées à raison de 4 x 10⁵/ml dans du RPMI 1640-5 % de FCS avec ou sans cellules L transfectées par 10⁵/ml de CD40L, (fourni par le Docteur Sem Saeland, Schering-Plough, Dardilly, France). Lorsque cela était indiqué, on a ajouté de l'IFN- γ humain recombinant (1000 U/ml, R&D Systems). On a recueilli les surnageants 24 h à 30 h après stimulation et on les a stockés à -70°C. On a mesuré les quantités de IL-10 et p70 IL-12 par ELISA selon le mode opératoire du fabricant (R&D Systems).

Les DC immatures obtenues avec du GM-CSF/IL-4 n'ont pas produit p70 IL-12 mais ont produit des quantités très élevées de IL-10 après déclenchement par CD40 (tableau 5). L'addition de IFN- γ avec la stimulation par CD40 a entraîné une diminution de 30 fois de la production d'IL-10 par des DC immatures activées par CD40. L'induction de la maturation des DC avec du TNF- α a entraîné une diminution dramatique de la production de IL-10 induite

par CD40 (réduction moyenne de 10 fois) en association avec l'induction de l'expression de IL-12. L'addition de IFN- γ a encore inhibé la production de IL-10 par des DC matures. Ceci est en accord avec les rapports précédents montrant que l'IFN- γ pouvait être un cofacteur pour la production de IL-12 induite par CD40 (29,30). Toutefois, pour l'échantillon testé des trois autres patients, l'IFN- γ a réduit la production de IL-12 par DC obtenue en présence de GM-CSF/IL-4 et TNF- α . Enfin, l'induction d'une DC totalement mature avec du TNF- α et PGE2 a entraîné une production réduite de IL-10 et IL-12 après stimulation par CD40 par rapport à TNF- α seul.

EXEMPLE 8 : Réaction des lymphocytes mixtes allogènes (MLR)

On a purifié des lymphocytes T non activés (HLA DR⁻) à partir de sang périphérique de volontaires en bonne santé par deux cycles de sélection négative en utilisant des microbilles revêtues de CD14 et de CD19 (Dynal, Oslo, Norvège), suivi par un cocktail d'anticorps mAbs CD16, CD56 et HLA-DR (Immunotech) et de microbilles d'anti-Ig de souris de chèvre (Dynal). La pureté des cellules T CD3⁺ était supérieure à 97 %. On a ajouté des nombres progressifs de DC traitées par de la mitomycine (50 μ g/ml) à $1,5 \times 10^5$ cellules T allogènes dans 200 μ l de RPMI-5 % de SAB. Après 5 jours de culture, on a mesuré la prolifération des cellules T par incorporation de thymidine tritiée (1 μ Ci/puits) pendant les 12 dernières heures. On a exprimé les résultats par les coûts moyens par minute (cpm) \pm l'écart type déterminé dans des puits de culture sextuplés.

Les résultats de la figure 6 montrent que la maturation des DC obtenues dans du X-VIVO 15-2 % de HA les a transformées en stimulateurs des cellules T allogéniques aussi puissants que les DC matures produites dans du RPMI-10 % de FCS. Le TNF- α seul a donné les mêmes résultats que l'association de TNF- α et PGE2.

Références

1. Hart, D. N. J. 1998. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 90:3245.
- 5 2. Banchereau, J. and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245.
- 10 3. Fanger, N. A., D. Voigtlaender, C. Liu, S. Swink, K. Wardwell, J. Fisher, R. F. Graziano, L. C. Pfefferkorn, and P. M. Guyre. 1997. Characterization of expression, cytokine regulation, and effector function of the high affinity IgG receptor Fc gamma RI (CD64) expressed on human blood dendritic cells. *J. Immunol.* 158:3090.
- 15 4. Fanger, N. A., K. Wardwell, L. Shen, T. F. Tedder, and P. M. Guyre. 1996. Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J. Immunol.* 157:541.
- 20 5. Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli, and A. Lanzavecchia. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products [see comments]. *J Exp. Med.* 182:389.
- 25 6. Albert, M. L., S. F. A. Pearce, L. M. Francisco, B. Sauter, P. Roy, R. L. Silverstein, and N. Bhardwaj. 1998. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes [In Process Citation]. *J. Exp. Med.* 188:1359.
- 30 7. Sozzani, S., P. Allavena, G. D'Amico, W. Luini, G. Bianchi, M. Kataura, T. Imai, O. Yoshie, R. Bonecchi, and A. Mantovani. 1998. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J. Immunol.* 161:1083.

8. Sallusto, F., P. Schaerli, P. Loetscher, C. Schaniel, D. Lenig, C. R. Mackay, S. Qin, and A. Lanzavecchia. 1998. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.* 28:2760.
 - 5
 9. Lin, C. L., R. M. Suri, R. A. Rahdon, J. M. Austyn, and J. A. Roake. 1998. Dendritic cell chemotaxis and transendothelial migration are induced by distinct chemokines and are regulated on maturation. *Eur. J. Immunol.* 28:4114.
 - 10
 10. Tarte, K. and B. Klein. 1999. Dendritic-based vaccine: a promising approach for cancer immunotherapy. *Leukemia* 13:653.
 11. Nestle, F. O., S. Alijagic, M. Gilliet, Y. Sun, S. Grabbe, R. Dummer, G. Burg, and D. Schadendorf. 1998. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat. Med.* 4:328.
 - 15
 12. Romani, N., D. Reider, M. Heuer, S. Ebner, E. Kampgen, B. Eibl, D. Niederwieser, and G. Schuler. 1996. Generation of mature dendritic cells from human blood. An -improved method with special regard to clinical applicability. *J. Immunol. Methods* 196:137.
 - 20
 13. Reddy, A., M. Sapp, M. Feldman, M. Subklewe, and N. Bhardwaj. 1997. A monocyte conditioned medium is more effective than defined cytokines in mediating the terminal maturation of human dendritic cells. *Blood* 90:3640.
 - 25
 14. Jonuleit, H., U. Kuhn, G. Muller, K. Steinbrink, L. Paragnik, E. Schmitt, J. Knop, and A. H. Enk. 1997. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur. J. Immunol.* 27:3135.
 - 30
 15. Murphy, G., B. Tjoa, H. Ragde, G. Kenny, and A. Boynton. 1996. Phase I clinical trial: T-cell therapy for prostate cancer using autologous dendritic cells pulsed with HLA-A0201-specific peptides from prostate-specific membrane antigen. *Prostate* 29:371.
 - 35
-

16. Tjoa, B. A., S. J. Simmons, V. A. Bowes, H. Ragde, M. Rogers, A. Elgamal, G. M. Kenny, O. E. Cobb, R. C. Ireton, M. J. Troychak, M. L. Salgaller, A. L. Boynton, and G. P. Murphy. 1998. Evaluation of phase I/II clinical trials in prostate cancer with dendritic cells and PSMA peptides. *Prostate* 36:39.
- 5 17. Thurner, B., C. Roder, D. Dieckmann, M. Heuer, M. Kruse, A. Glaser, P. Keikavoussi, E. Kampgen, A. Bender, and G. Schuler. 1999. Generation of large number of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J. Immunol. Methods* 223:1.
- 10 18. Soruri, A., A. Fayyazi, R. Gieseler, T. Schlott, T. M. Runger, C. Neumann, and J. H. Peters. 1998. Specific autologous anti-melanoma T cell response in vitro using monocyte-derived dendritic cells. *Immunobiology* 198:527.
- 15 19. Anton, D., S. Dabadghao, K. Palucka, G. Holm, and Q. Yi. 1998. Generation of dendritic cells from peripheral blood adherent cells in medium with human serum. *Scand. J. Immunol.* 47:116.
- 20 20. Kim, C. J., T. Prevette, J. Cormier, W. Overwijk, M. Roden, N. P. Restifo, S. A. Rosenberg, and F. M. Marincola. 1997. Dendritic cells infected with poxviruses encoding MART-1/Melan A sensitize T lymphocytes in vitro. *J. Immunother.* 20:276.
- 25 21. Rieser, C., G. Bock, H. Klocker, G. Bartsch, and M. Thurnher. 1997. Prostaglandin E2 and tumor necrosis factor alpha cooperate to activate human dendritic cells: synergistic activation of interleukin 12 production. *J. Exp. Med.* 186:1603.
- 30 22. Holtl, L., C. Rieser, C. Papesch, R. Ramoner, G. Bartsch, and M. Thurnher. 1998. CD83+ blood dendritic cells as a vaccine for immunotherapy of metastatic renal-cell cancer [letter] [In Process Citation]. *Lancet* 352:1358.

23. Apostolopoulos, V., C. Osinski, and I. F. McKenzie. 1998. MUC1 cross-reactive Gal alpha(1,3)Gal antibodies in humans switch immune responses from cellular to humoral [see comments]. *Nat. Med.* 4:315.
- 5 24. Abdel-Wahab, Z., P. DeMatos, D. Hester, X. D. Dong, and H. F. Seigler. 1998. Human dendritic cells, pulsed with either melanoma tumor cell lysates or the gp100 peptide(280-288), induce pairs of T-cell cultures with similar phenotype and lytic activity. *Cell Immunol.* 186:63.
- 10 25. Morse, M. A., R. E. Coleman, G. Akabani, N. Niehaus, D. Coleman, and H. K. Lyster. 1999. Migration of human dendritic cells after injection in patients with metastatic malignancies. *Cancer Res* 59:56.
- 15 26. Tarte, K., S. J. Olsen, Z. Y. Lu, E. Legouffe, J. F. Rossi, Y. Chang, and B. Klein. 1998. Clinical grade functional dendritic cells from patients with multiple myeloma are not infected with Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Blood* 91:1852.
- 20 27. Tarte, K., Z. Y. Lu, G. Fiol, E. Legouffe, J. F. Rossi, and B. Klein. 1997. Generation of virtually pure and potentially proliferating dendritic cells from non-CD34 apheresis cells from patients with multiple myeloma. *Blood* 90:3482.
- 25 28. Zhang, X. G., J. P. Gaillard, N. Robillard, Z. Y. Lu, Z. J. Gu, M. Jourdan, J. M. Boiron, R. Bataille, and B. Klein. 1994. Reproducible obtaining of human myeloma cell lines as a model for tumor stem cell study in human multiple myeloma. *Blood.* 83:3654.
- 30 29. Kalinski, P., J. H. N. Schuitemaker, C. M. U. Hilkens, E. A. Wierenga, and M. L. Kapsenberg. 1999. Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN-g and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells. *J. Immunol.* 162:3231.
-

30. Snijders, A., P. Kalinski, C. M. U. Hilkens, and M. L. Kapsenberg. 1998. High-level IL-12 production by human dendritic cells requires 2 signals . *Int. Immunol.* 10:1593.
- 5 31. Liu, P., M. Rowley, and B. Van Ness. 1996. Wildtype RB and p53 can suppress autocrine IL-6 production and proliferation of U266 myeloma cells. *Blood* 88:389.
- 10 32. Nazaruk, R. A., R. Rochford, M. V. Hobbs, and M. J. Cannon. 1998. Functional diversity of the CD8+ T-cell response to Epstein-Barr Virus (EBV): Implication for the pathogenesis of EBV-associated lymphoproliferative disorders. *Blood* 91:3875.
- 15 33. Carter, L. and R. W. Dutton. 1996. Type 1 and type 2: a fundamental dichotomy for all T-cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* 8:336.
- 20 34. Steinbrink, K., H. Jonuleit, G. Muller, G. Schuler, J. Knop, and A. H. Enk. 1999. Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8+ T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood* 93:1634.
- 25 35. Kalinski, P., J. H. N. Schuitemaker, C. M. U. Hilkens, and M. L. Kapsenberg. 1998. Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. *J. Immunol.* 161:2804.
- 30 36. Cella, M., D. Scheidegger, K. Palmer Lehmann, P. Lane, A. Lanzavecchia, and G. Alber. 1996. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J. Exp. Med.* 184:747.
-

37. Rissoan, M-C., V. Soumelis, N. Kadowaki, G. Grouard, F. Briere, R. de Waal Malefyt, and Y. J. Liu. 1999. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 283:1183.
- 5 38. Zhou, L. J. and T. F. Tedder. 1995. A distinct pattern of cytokine gene expression by human CD83+ blood dendritic cells. *Blood* 86:3295.
-

Tableau I
Analyse phénotypique des DC

Milieu	Cytokines	Rendement (%)	Moyenne des pourcentages de cellules positives (IMF)				
			CD14	HLA-DR	CD83	CD80	CD86
RPMI-FCS	GM/IL-4	9	10 (32)	100 (180)	3	80 (72)	82 (53)
	GM/IL-4/TNF	10	4	100 (465)	86 (47)	98 (120)	90 (126)
	GM/IL-4/TNF/PGE2	10	3	100 (417)	94 (65)	98 (190)	100 (188)
XV-sérum AB	GM/IL-4	12	80 (52)	100 (115)	0	77 (32)	90 (22)
	GM/IL-4/TNF	14	25 (69)	100 (224)	25 (40)	95 (60)	85 (50)
	GM/IL-4/TNF/PGE2	13	40 (50)	100 (173)	52 (80)	90 (60)	100 (95)
XV-plasma autologue	GM/IL-4	18	40 (35)	100 (90)	0	25 (30)	90 (65)
	GM/IL-4/TNF	19	20 (29)	100 (125)	20 (55)	35 (42)	90 (110)
	GM/IL-4/TNF/PGE2	23	12 (60)	100 (145)	80 (65)	80 (58)	110 (160)
XV-sérum autologue	GM/IL-4	22	50 (35)	100 (95)	9 (12)	28 (26)	85 (68)
	GM/IL-4/TNF	25	26 (66)	100 (120)	17 (25)	39 (33)	90 (92)
	GM/IL-4/TNF/PGE2	23	40 (70)	100 (115)	59 (66)	72 (68)	95 (150)
XV-HA	GM/IL-4	16	21 (13)	100 (172)	0	82 (46)	85 (80)
	GM/IL-4/TNF	16	5	100 (270)	55 (43)	100 (110)	95 (97)
	GM/IL-4/TNF/PGE2	20	3	100 (251)	85 (66)	100 (136)	100 (133)

XV-HA = milieu X-VIVO 15-2 % d'albumine humaine

GM = facteur GM-CSF

Tableau II

**Analyse phénolotypique de DC obtenues par culture dans du milieu
XV-HA complétement avec GM-CSF, IL-4 et TNF- α avec ou sans PGE2**

5

Cytokines	CD14	HLA-DR	CD83	CD80	CD86
GM/IL-4/TNF	2,6 \pm 8,2	100	64 \pm 19	100	100
Moyenne des % ^{***} \pm SD	-	299 \pm 183	44 \pm 7	140 \pm 49	251 \pm 211
GM/IL-4/TNF/PGE2	1,5 \pm 4	100	83 \pm 12 ^{**}	100	100
Moyenne des % ^{***} \pm SD	-	265 \pm 124	61 \pm 25 [*]	190 \pm 85	345 \pm 271

* p < 0,01 par comparaison aux cellules cultivées avec GM/IL-4/TNF

** p < 0,05 par comparaison aux cellules cultivées avec GM/IL-4/TNF

*** moyenne des % = moyenne des % de cellules positives

10 GM = facteur GM-CSF

Tableau III
Profil des récepteurs des DC

Conditions de culture	Moyenne des % de cellules positives (IFM)			
	MR	CD36	α vb3	α vb5
XV-HA GM/IL-4	98 (233)	88 (89)	0	87 (43)
XV-HA GM/IL-4/TNF	80 (95)*	37 (47)**	0	68 (32)*
XV-HA GM/IL-4/TNF /PGE2	74 (91)*	25 (33)**	0	58 (36)*

5

XV-HA = milieu X-VIVO 15 - 2 % HA

* $p < 0,01$ par comparaison aux cellules cultivées avec GM/IL-4

** $p < 0,05$ par comparaison aux cellules cultivées avec GM/IL-4

Tableau IV : CCR5

Conditions de culture	GM+IL-4	GM+IL-4+TNF	GM+IL-4+TNF+PGE2
Donneur 1	8	4	3
Donneur 2	12	6	5
Donneur 3	14	6	5
Donneur 4	10	5	5
Donneur 5	10	4	4
Donneur 6	11	6	6
IFM	10,8	5,2	4,7
	p = 0,03		p = 0,25

Tableau V
Production de cytokines par les DC

Conditions de culture	Production de cytokines (pg/ml)					
	sans stimulation		stimulation avec CD40		stimulation avec CD 40 + IFN- γ	
	IL-10	IL-12	IL-10	IL-12	IL-10	IL-12
XV-HA GM/IL-4	25 \pm 9 (16-35)	0	1619 \pm 529 (1105-2360)	5,5 \pm 6,3 (0-11)	50 \pm 57 (14-115)	158 \pm 274 (0-476)
XV-HA GM/IL-4/TNF	0	0	137 \pm 104 (62-285)	84 \pm 23 (55-105)	7 \pm 7 (0-21)	299 \pm 518 (0-898)
XV-HA GM/IL-4/TNF/PGE2	0	0	64 \pm 61 (0-145)	7,2 \pm 8,8 (0-18)	0	16 \pm 29 (0-50)

REVENUDICATIONS

1. Procédé pour l'obtention de cellules dendritiques, caractérisé en ce qu'il consiste :
- 1) à cultiver, pendant 4 à 6 jours, de préférence 5 jours, des cellules mononuclées issues de cytophérèse après mobilisation, dans un milieu exempt de sérum complété avec de l'albumine humaine en présence d'un facteur stimulant les colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF) et d'une interleukine (IL) bloquant la différenciation vers la voie macrophagique ;
- 2) à ajouter au milieu de culture du TNF- α et éventuellement un médiateur inflammatoire et à poursuivre la culture pendant environ 1 à 4 jours, de préférence 2 jours supplémentaires ;
- 3) à récupérer les cellules dendritiques ainsi formées.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'interleukine est l'interleukine-4 ou l'interleukine-13.
3. Procédé selon l'une des revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le médiateur inflammatoire est le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α).
4. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le médiateur inflammatoire est le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) et la prostaglandine E2 (PGE2).
5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les cellules mononuclées sont des cellules mononuclées obtenues par cytophérèse après mobilisation par chimiothérapie et/ou par au moins un facteur de croissance cellulaire.
6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le GM-CSF, l'interleukine, le TNF- α et la PGE2 sont chacun utilisés à raison de 1 à 1000 ng/ml de milieu.
7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'albumine humaine est utilisée à raison de 1 à 2 % (poids/volume de milieu), de préférence 2 %.
8. Cellules dendritiques irréversibles caractérisées en ce qu'elles sont $\alpha\text{v}\beta 3^-$, $\alpha\text{v}\beta 5^+$, $\text{CCR}5^-$ et $\text{CCR}7^+$.

9. Utilisation des cellules dendritiques irréversibles $\alpha\beta3^-$, $\alpha\beta5^+$, $CCR5^-$ et $CCR7^+$ pour la préparation d'un agent d'immunothérapie utile pour le traitement de toute maladie impliquant le système immunitaire.

REVENDICATIONS

1. Procédé pour l'obtention de cellules dendritiques, caractérisé en ce qu'il
5 consiste :
 - 1) à cultiver, pendant 4 à 6 jours, de préférence 5 jours, des cellules mononuclées issues de cytophérèse après mobilisation, dans un milieu exempt de sérum complémenté avec de l'albumine humaine en présence d'un facteur stimulant les colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF) et d'une interleukine (IL) bloquant la
10 différenciation vers la voie macrophagique ;
 - 2) à ajouter au milieu de culture du TNF- α et éventuellement un médiateur inflammatoire et à poursuivre la culture pendant environ 1 à 4 jours, de préférence 2 jours supplémentaires ;
 - 15 3) à récupérer les cellules dendritiques ainsi formées.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'interleukine est l'interleukine-4 ou l'interleukine-13.
3. Procédé selon l'une des revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le médiateur inflammatoire est le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α).
- 20 4. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le médiateur inflammatoire est le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) et la prostaglandine E2 (PGE2).
5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les cellules mononuclées sont des cellules mononuclées obtenues par
25 cytophérèse après mobilisation par chimiothérapie et/ou par au moins un facteur de croissance cellulaire.
6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le GM-CSF, l'interleukine et le TNF- α sont chacun utilisés à raison de 1 à 1000 ng/ml de milieu.
- 30 7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'albumine humaine est utilisée à raison de 1 à 2 % (poids/volume de milieu), de préférence 2 %.
8. Cellules dendritiques irréversibles caractérisées en ce qu'elles sont $\alpha\text{v}\beta 3^-$, $\alpha\text{v}\beta 5^+$, CCR5 $^-$ et CCR7 $^+$.

été soumis à une chimiothérapie, à savoir à un traitement spécifique à l'aide d'un agent chimiothérapeutique et éventuellement d'un facteur de croissance cellulaire, soit de patients présentant une maladie infectieuse, virale ou parasitaire qui ont été traités avec un facteur de croissance cellulaire, tel que les cytokines, y compris les facteurs de croissance hématopoïétiques.

A titre d'exemple de facteur de croissance qui peuvent être utilisés pour la mobilisation des cellules mononuclées, on peut citer :

- les facteurs stimulants les colonies de granulocytes (G-CSF), tels que les produits connus sous les dénominations commerciales « filgrastim NEUPOGEN » de Amgen-Roche, « Lenograstim GRANOCYTE » de Rhône-Poulenc/Chugai ;

- les facteurs stimulant les colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF), tel que les produits connus sous les dénominations commerciales LEUCOMAX de Schering Plough ou le facteur de croissance des cellules souches (SCF) de Amgen.

Les cellules mononuclées mobilisées qui sont mises en œuvre selon l'invention comprennent notamment les monocytes, les lymphocytes, les cellules souches hématopoïétiques.

La mobilisation par chimiothérapie est réalisée à l'aide de l'agent chimiothérapeutique approprié au type de cancer présenté par le patient, donneur des cellules à utiliser dans le procédé de l'invention. On peut utiliser un agent chimiothérapeutique quelconque, tel que par exemple le cyclophosphamide.

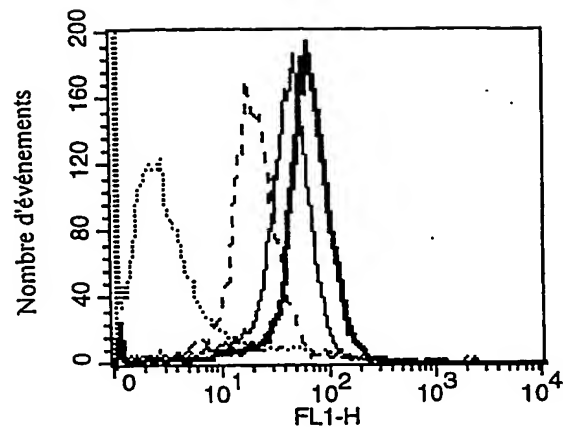
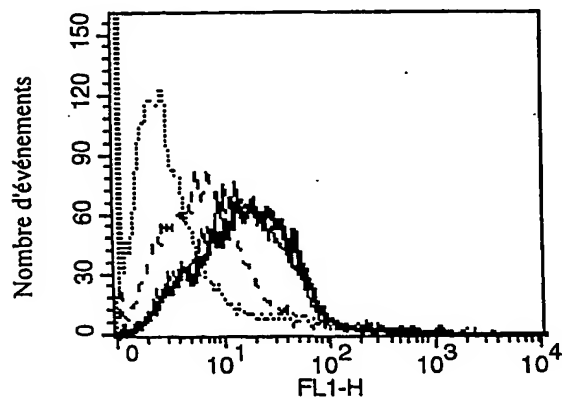
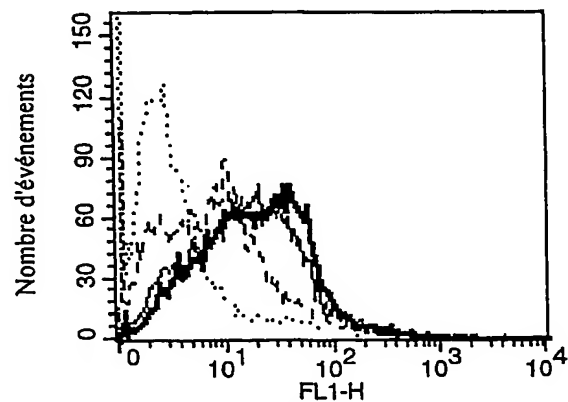
Les quantités de GM-CSF, d'interleukine, de TNF- α et de PGE2 à utiliser dans le procédé de l'invention sont celles qui sont habituellement utilisées pour les cultures cellulaires.

On précisera que le GM-CSF peut être utilisé à raison de 1 ng/ml à 1 000 ng/ml, de préférence 50 à 500 ng/ml, avantageusement 100 ng/ml de milieu.

L'interleukine est généralement utilisée en des quantités allant de 1 ng/ml à 1 000 ng/ml, de préférence 10 à 50 ng/ml, avantageusement 25 ng/ml de milieu.

On peut également utiliser le TNF- α à raison de 1 ng/ml à 1 000 ng/ml et la PGE2 à raison de 10 ng/ml à 10 μ g/ml, avantageusement de 20 ng/ml à 1 μ g/ml.

Figure 1

A. GM-CSF + IL-4**B. GM-CSF + IL-4 + TNF****C. GM-CSF + IL-4 + TNF + PGE2**

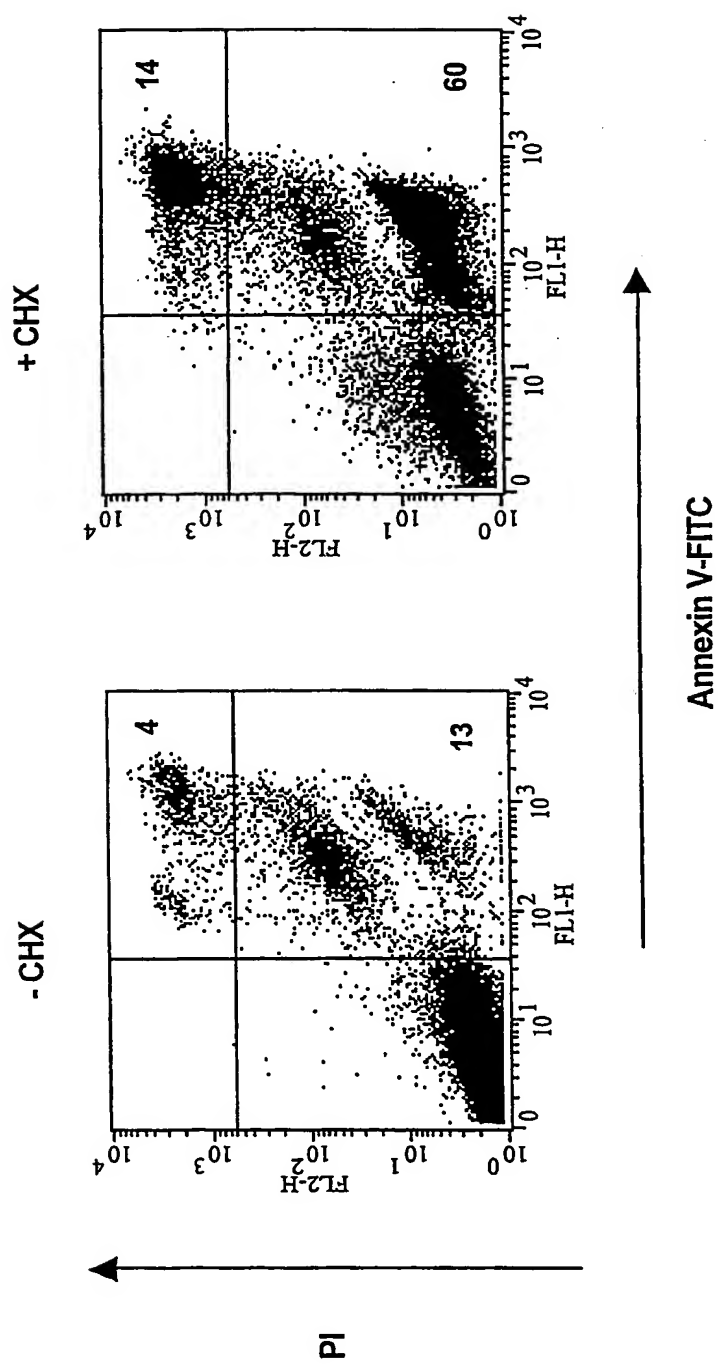


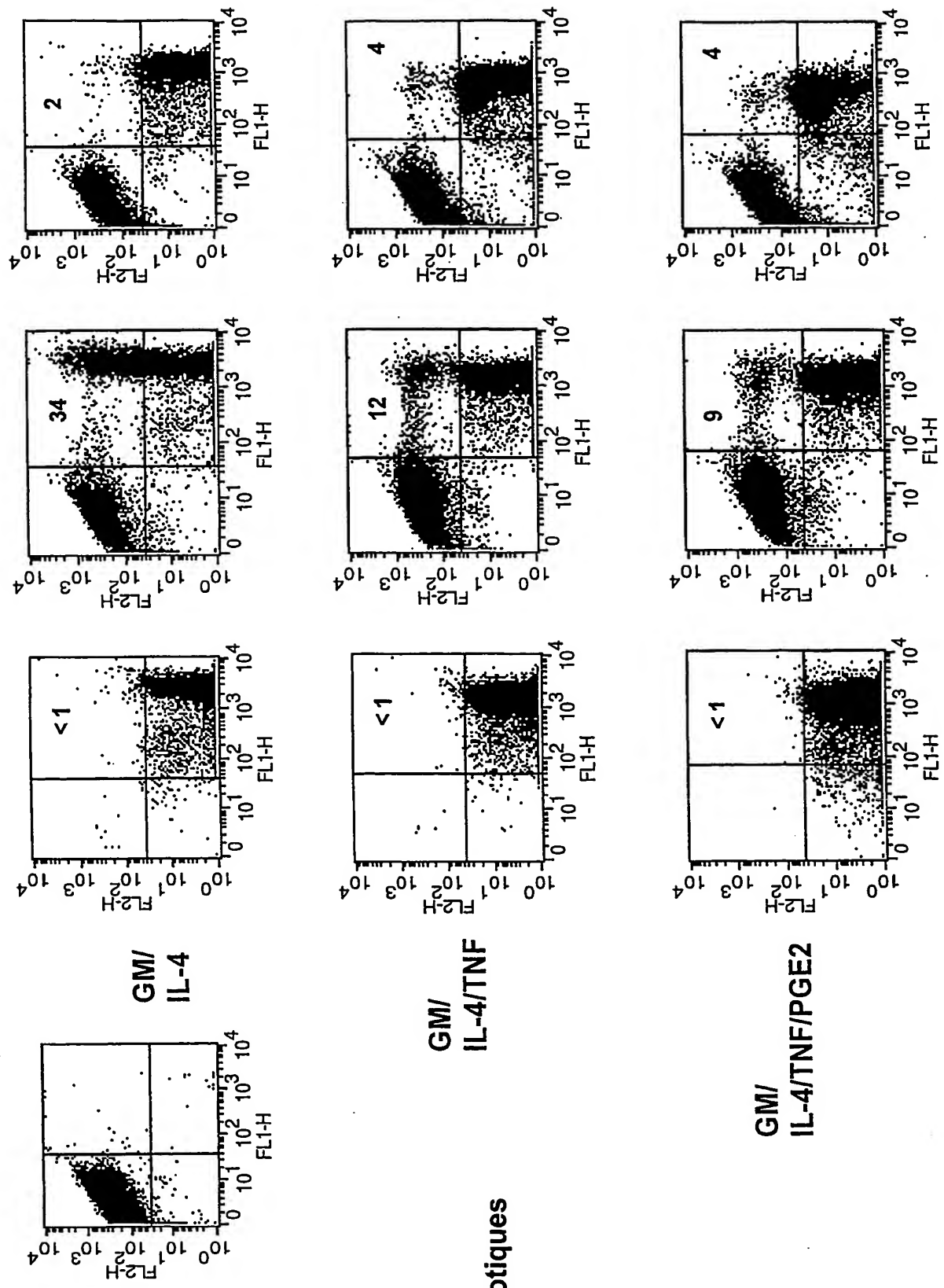
Figure 2

XG-1 + DC 4°C

XG-1 + DC 37°C

DC seules

XG-1 seules



XG-1 Apoptotiques

Figure 3

DC

CCR5

Figure 4

A.

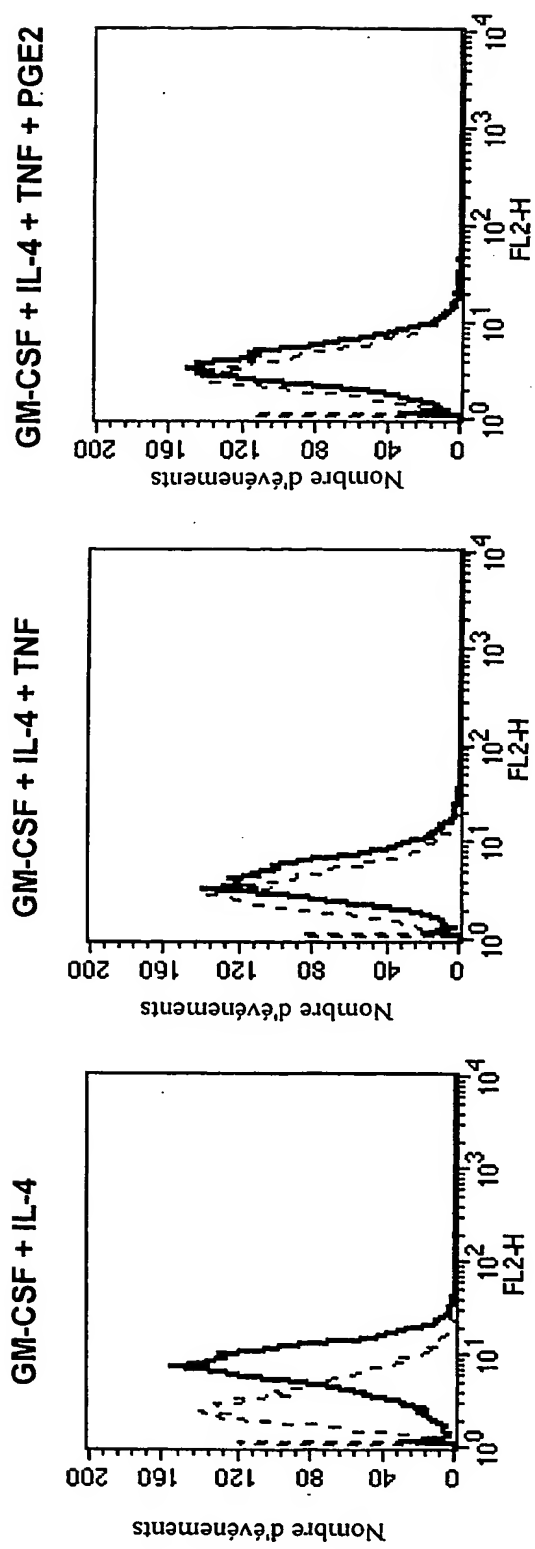
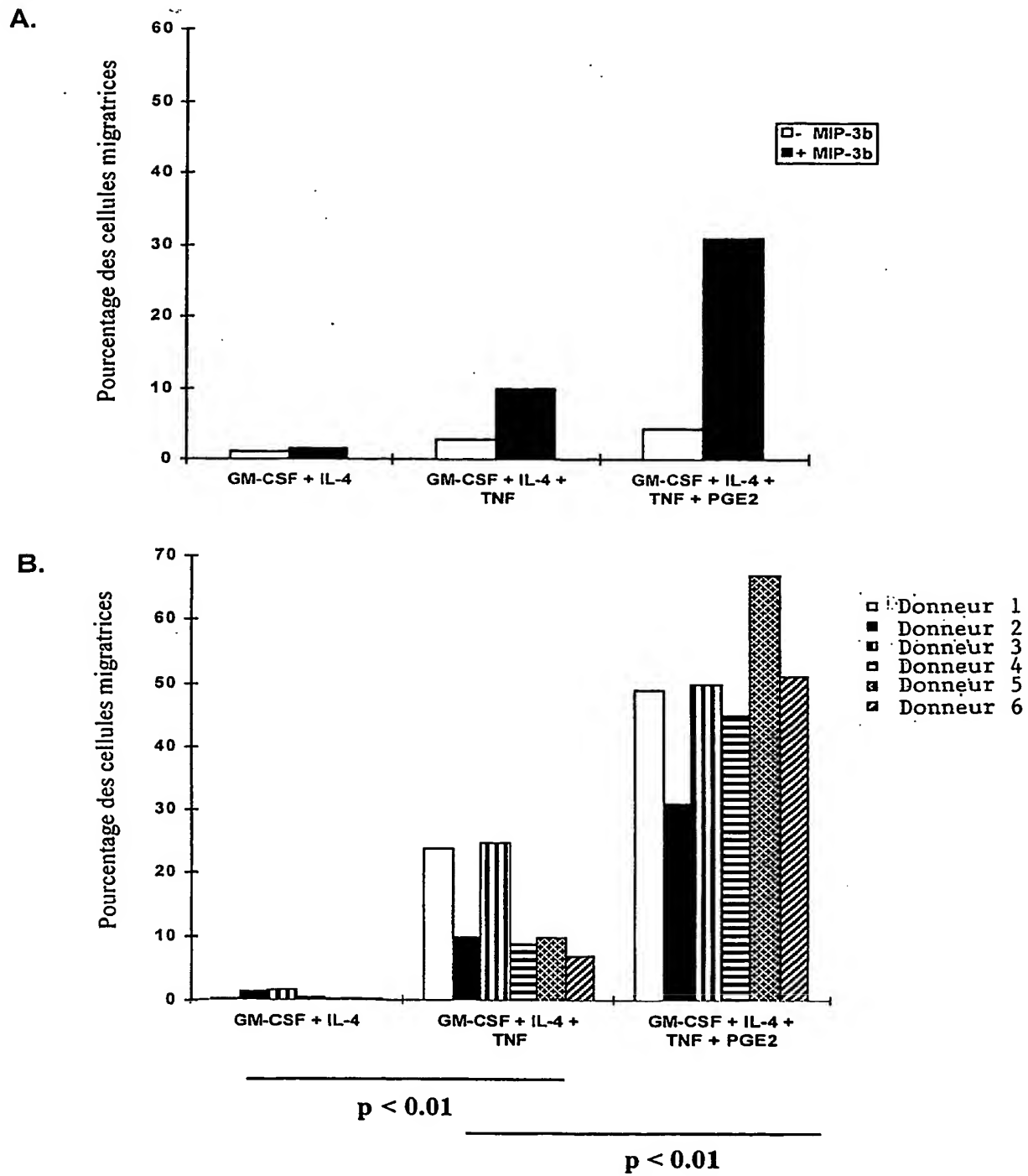


Figure 5



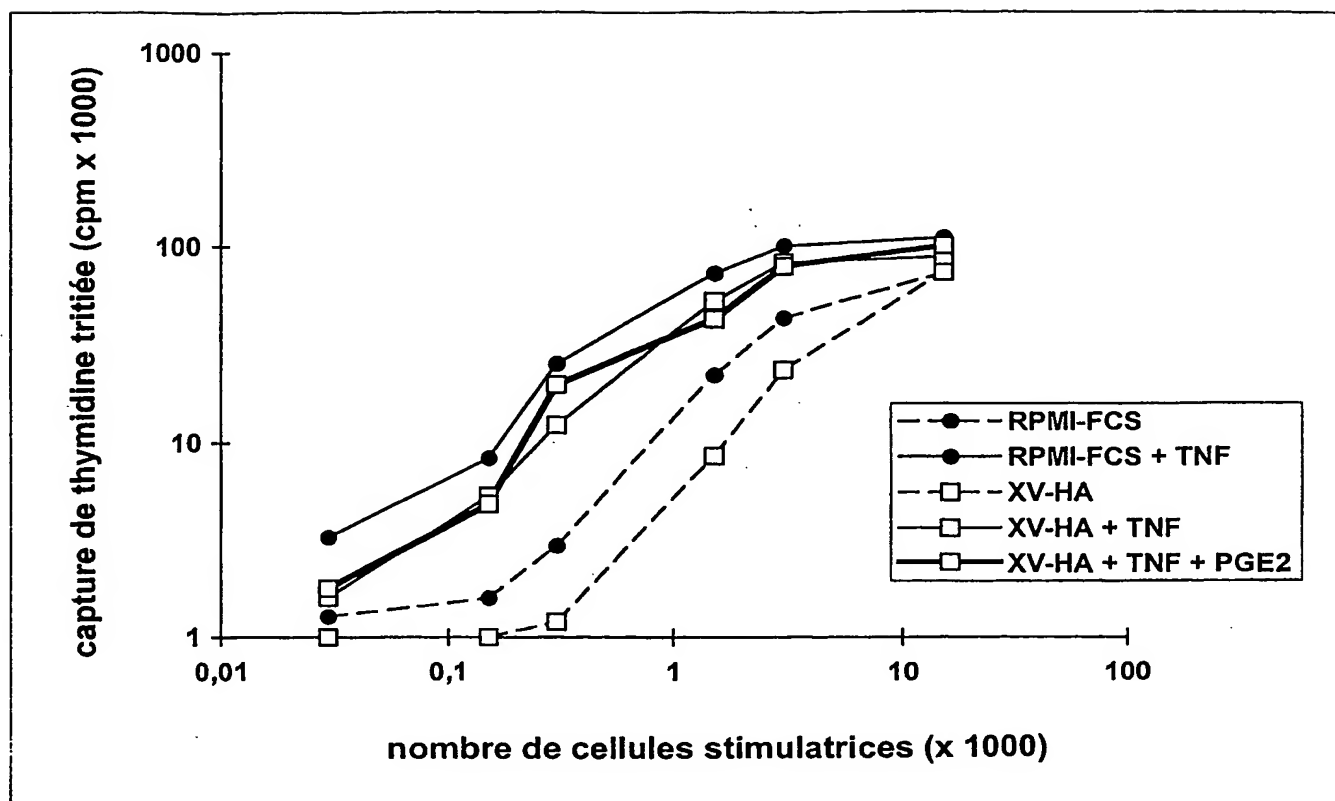


Figure 6

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

01 NOV 2001



Référence du dossier du déposant ou du mandataire 258820MLG1FD	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/02173	Date du dépôt international (jour/mois/année) 28/07/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 29/07/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N5/06		
Déposant CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE et al		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 5 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
 - ☒ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent 4 feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☐ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 27/02/2001	Date d'achèvement du présent rapport 30.10.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Trommsdorff, M N° de téléphone +49 89 2399 7361 

THIS PAGE BLANK (USE P10)

RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR00/02173

I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

Description, pages:

1,4-28	version initiale			
2,3	reçue(s) le	01/10/2001	avec la lettre du	28/09/2001

Revendications, N°:

1-8	version initiale			
9-11	reçue(s) le	01/10/2001	avec la lettre du	28/09/2001

Dessins, feuilles:

1/6-6/6	version initiale
---------	------------------

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/02173

- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffirable par ordinateur sont identiques à celles du listages des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
☐ des revendications, n^{os} :
☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-11 Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications Non : Revendications 1-11
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-9 Non : Revendications 10, 11: pas d'opinion

2. Citations et explications
voir feuille séparée

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1. Documents cités

Il est fait référence aux documents suivants:

- D1: TARTE K ET AL: 'Generation of virtually pure and potentially proliferating dendritic cells from non-cd34 apheresis cells from patients with multiple myeloma.' BLOOD, (1997) 90, p. 3482-95
- D2: WO 98 53048 A (THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA) 26 novembre 1998 (1998-11-26)
- D3: TARTE K ET AL: 'Clinical-grade functional dendritic cells from patients with multiple myeloma are not infected with Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus.' BLOOD, (15 MAR 1998) 91,p.1852-7
- D4: FRESHNEY R.: 'Culture of animal cells' 1987, ALAN R. LISS, INC., NY,US, p. 154920

2. Concernant le point V

Déclaration motivée selon la règle 66.2(a)(ii) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

- 2.1. Les revendications 1 à 9 ont pour objet un procédé d'obtention de cellules dendritiques dans un milieu exempt de sérum complémenté avec de l'albumine humaine en présence de GM-CSF, d'une interleukine et de TNF- α et les cellules ainsi obtenues.

D1 et D3 décrivent tous deux des procédés d'obtention de cellules dendritiques qui utilisent les mêmes conditions et le même milieu de culture (X-VIVO) en présence de 100ng/ml GM-CSF, de 25ng/ml d'IL-4 ou d'IL-13 et de 20ng/ml de TNF- α (D1: p.3491, dernier paragraphe-p.3492, premier paragraphe et figs.12 et 13; D3: p.1853, colonne de gauche et p.1854, fig.1). La seule caractéristique technique qui différencie le milieu de D1 et D3 du milieu revendiqué est l'absence d'albumine humaine.

L'albumine humaine n'est cependant pas indispensable à la production de cellules dendritiques. L'addition d'albumine n'est pas non plus associée à un effet technique inattendu. En effet, le tableau 1 de la description montre que l'utilisation de sérum XV-HA n'aboutit ni à un rendement, ni à une viabilité plus élevée des cellules dendritiques par rapport à d'autres milieux.

La méthode de culture revendiquée ne représente donc qu'une alternative aux

THIS PAGE BLANK (USPTO)

méthodes déjà connues dans l'art sans avantage technique spécifique.

Par conséquent, l'objet des revendications 1 à 9 manque d'activité inventive (Art. 33(1) et (3) PCT).

- 2.2. Les revendications 10 et 11 ont pour objet des procédés de traitement thérapeutique utilisant lesdites cellules dendritiques.

L'idée d'utiliser des cellules dendritiques pour le traitement de maladies immunitaires n'est pas nouvelle et déjà suggérée et décrite dans plusieurs documents:

D1 décrit la préparation de cellules dendritiques dans un milieu exempt de sérum et suggère que les cellules dendritiques ainsi obtenues pourraient être utilisées comme cellules présentatrices d'antigènes pour des peptides spécifiques dans le traitement de cancer pour générer une réponse antitumorale chez les patients traités (p.3494).

D2 décrit l'utilisation de cellules dendritiques *ex vivo* ou *in vivo* pour générer une réponse immunitaire chez un patient contre une tumeur ou un virus (p.34, l.11-p.37, l.26 et p.53-54, exemple 3).

La seule caractéristique technique qui différencie l'application de l'art de la technique antérieure semble là encore être l'utilisation d'albumine humaine.

L'objet des revendications 11 à 13 n'est donc également pas inventif pour les raisons indiquées ci-dessus (Art. 33(1) et (3) PCT).

- 2.3. La présente Administration considère que l'objet des revendications 10 et 11 est visé par les dispositions de la règle 67.1 (iv) PCT. C'est pourquoi il ne sera pas émis d'opinion quant à la question de savoir si l'objet de ces revendications est susceptible d'application industrielle (article 34(4) a) i) PCT).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Lorsqu'elles sont exposées à des signaux de maturation, donnés principalement par les antigènes, les cytokines inflammatoires ou les produits bactériens, les DC perdent leurs capacités phagocytaires et endocytaires (5,6) mais accroissent l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I, du CMH de classe II, l'expression de CD80 et CD86 et deviennent de très puissantes cellules présentant des antigènes (APC). Le passage du stade immature au stade mature est associé à l'expression des récepteurs des chémokines. Les DC matures ont une expression diminuée de CCR1 et CCR5, qui sont les récepteurs des chémokines inflammatoires, les protéines inflammatoires de macrophages MIP-1 α , MIP-1 β et RANTES, et de façon concomitante, elles ont une expression augmentée de CCR7, qui est le récepteur pour le ligand E1B (ELC)/MIP-3 β , lequel est exprimé de façon constitutive dans les organes lymphoïdes secondaires (7-9). Ces changements dans l'expression des récepteurs des chémokines sont importants pour la circulation *in vivo* des DC. Les DC immatures sont recrutées par les chémokines inflammatoires dans les sites d'entrée des antigènes. Après activation par les antigènes et stimuli inflammatoires, elles perdent les récepteurs CCR1 et CCR5 et acquièrent l'expression de CCR7. Les DC matures peuvent ensuite entrer dans les vaisseaux lymphatiques et migrer vers les ganglions lymphatiques afférents où elles présentent des épitopes dérivés d'antigènes pour les lymphocytes naïfs et les lymphocytes mémoires présents dans ces ganglions.

Ainsi, on a déjà proposé de les utiliser en tant que vecteurs pour des vaccinations anti-tumorales (10). Récemment, Nestle et al. ont montré que l'injection intralymphatique de DC immatures activées avec des peptides tumoraux ou des lysats cellulaires tumoraux ont pu provoquer une réponse immunitaire anti-mélanome (11).

L'utilisation de cellules dendritiques à des fins d'immunothérapie nécessite plusieurs millions de cellules à plusieurs reprises. De plus, ces cellules doivent être capables de circuler dans le corps humain de manière sélective vers les ganglions pour que le traitement soit efficace. Il importe également de disposer de cellules engagées de façon irréversible dans la voie de différenciation dendritique, c'est-à-dire de cellules matures qui ne soient pas susceptibles de se transformer dans l'organisme en macrophages.

Plusieurs études concernant la modulation des récepteurs des chémokines ont été réalisées avec des DC obtenues par culture dans un milieu contenant du sérum de veau fœtal (FCS), voir notamment WO98/53048. Or, les antigènes

THIS PAGE BLANK (USPTO)

xénogènes peuvent être immunodominants et peuvent gêner le développement de l'immunité anti-tumorale spécifique.

Différentes équipes de chercheurs se sont donc concentrées sur la production de DC dérivées de monocytes dans des milieux exempts de FCS en utilisant des milieux complémentés avec 1 à 10 % de plasma autologue (12-17), de sérum autologue (18) ou d'un pool de sérums humains AB (13,19-22,31). Toutefois, même le sérum autologue peut poser un problème puisqu'il contient de nombreuses protéines, en particulier des anticorps (23) qui peuvent modifier la voie de fixation et de modification intracellulaire des antigènes. De plus, certains antigènes tumoraux de type MUC-1 dans plusieurs cancers ou l'immunoglobuline monoclonale dans le myélome multiple, sont présents dans le sérum à des taux élevés et variables, ce qui peut affecter une présentation reproductible par les DC.

Pour toutes ces raisons, des procédés d'obtention de DC capables d'activer les lymphocytes T dans des milieux exempts de sérum ont été proposés (24-26).

Les demandes internationales WO98/23728, WO98/06823 et WO98/06826 décrivent également des procédés d'obtention des cellules dendritiques dans des milieux exempts de sérum. La demande internationale WO98/06826 décrit entre autre l'utilisation d'un milieu exempt de sérum, le milieu X-VIVO 15 complémenté avec 1% d'albumine humaine (HA). Il est précisé dans cette demande que l'utilisation de 1% de HA n'améliore pas de façon significative la croissance des cellules, leur phénotype ou leur capacité stimulante. De plus, l'expression de CD86 est augmentée au bout de 14 jours de culture dans un tel milieu.

On a maintenant trouvé, de façon surprenante, que l'on peut obtenir des quantités importantes de cellules dendritiques, qui peuvent être utilisées en immunothérapie par culture de cellules mononuclées particulières dans un milieu exempt de sérum convenablement complémenté avec de l'albumine humaine en présence d'un facteur stimulant la formation de colonies de granulocytes macrophages (GM-CSF) et d'une cytokine, en particulier l'interleukine-4 (IL-4) ou l'interleukine-13 (IL-13) puis en présence d'au moins un médiateur inflammatoire, tel que par exemple le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α).

Ainsi le procédé de l'invention consiste :

1) à cultiver pendant 4 à 6 jours, de préférence 5 jours des cellules mononuclées issues de cytophérèse après mobilisation dans un milieu exempt

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REVENDEICATIONS

1. Procédé pour l'obtention de cellules dendritiques, caractérisé en ce qu'il consiste :
 - 5 1) à cultiver, pendant 4 à 6 jours, des cellules mononuclées issues de cytophérèse après mobilisation, dans un milieu exempt de sérum complémenté avec de l'albumine humaine en présence d'un facteur stimulant les colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF) et d'une interleukine (IL) bloquant la différenciation vers la voie macrophagique ;
 - 10 2) à ajouter au milieu de culture du TNF- α et éventuellement un médiateur inflammatoire et à poursuivre la culture pendant environ 1 à 4 jours supplémentaires ;
 - 3) à récupérer les cellules dendritiques ainsi formées.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la culture de l'étape 15 1) est réalisée pendant 5 jours et celle de l'étape 2) pendant 2 jours ;
3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que l'interleukine est l'interleukine-4 ou l'interleukine-13.
4. Procédé selon l'une quelconque des revendication 1 à 3, caractérisé en ce 20 que le médiateur inflammatoire est le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α).
5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le médiateur inflammatoire est le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) et la prostaglandine E2 (PGE2).
6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce 25 que les cellules mononuclées sont des cellules mononuclées obtenues par cytophérèse après mobilisation par chimiothérapie et/ou par au moins un facteur de croissance cellulaire.
7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le GM-CSF, l'interleukine et le TNF- α sont chacun utilisés à raison de 1 30 à 1000 ng/ml de milieu.
8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que l'albumine humaine est utilisée à raison de 1 à 2 % (poids/volume de milieu).

35

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Empf. nr.: 431 P. 008

Empf. zeit: 01/10/2001 10:19

30

28 Septembre 2001

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que l'albumine humaine est utilisée à raison de 2 % (poids/volume de milieu).
10. Procédé de traitement immunothérapeutique, caractérisé en ce qu'il consiste :
- 5
- 1) à prélever à un patient à traiter des cellules mononuclées par cytophérèse après mobilisation par chimiothérapie et/ou avec un facteur de croissance cellulaire et éventuellement congélation/décongélation ;
- 10
- 2) à cultiver, pendant 4 à 6 jours, des cellules mononuclées issues de cytophérèse après mobilisation, dans un milieu exempt de sérum complétement avec de l'albumine humaine en présence d'un facteur stimulant les colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF) et d'une interleukine (IL) bloquant la différenciation vers la voie macrophagique ;
- 15
- 3) à ajouter au milieu de culture du TNF- α et éventuellement un médiateur inflammatoire et à poursuivre la culture pendant environ 1 à 4 jours supplémentaires en les activant par des antigènes spécifiques ;
- 4) à récupérer les cellules dendritiques ainsi formées et activées.
- 5) à réinjecter lesdites cellules dendritiques audit patient.
11. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que lesdites cellules dendritiques sont congelées/décongelées avant d'être réinjectées audit patient.
- 20

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)